

NETECHNICKÉ SHRUTÍ PROJEKTU POKUSŮ 72/2020

upravené podle PR 2020/569

Název projektu pokusů

GENOVÁ TERAPIE MODELU HUNTINGTONOVY CHOROBY POMOCÍ ZINC-FINGER REPRESORŮ

Doba trvání projektu pokusů - v měsících

16 měsíců, od schválení do 31. 12. 2021

Klíčová slova - maximálně pět ¹⁾

genová terapie, stereotaktická aplikace, mozek, miniprase

Účel projektu pokusů - zaškrtněte políčko; možno i více možností

☒ základní výzkum

☒ translační a aplikovaný výzkum

☐ kontrola kvality (včetně zkoušení bezpečnosti a účinnosti šarže)

☐ legislativní účely jiné zkoušení účinnosti a tolerance

☐ a běžná výroba zkoušení toxicity a jiné zkoušky bezpečnosti včetně farmakologie

☐ běžná výroba

☐ ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví a dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat

☐ zachování druhů

☒ vyšší vzdělávání

☐ odborná příprava za účelem získání, udržení nebo zlepšení odborných znalostí

☐ trestní řízení a jiné soudní řízení

☐ udržování populací ustálených geneticky upravených zvířat, která nebyla použita v jiných pokusech

Cíle projektu pokusů - např. řešení některých vědeckých neznámých nebo vědeckých či klinických potřeb

Cíle projektu:

1. Provedení pilotní studie na 6ks miniprasat, kterým bude jednorázově stereotakticky aplikován fyziologický roztok s gadolinem (do 3 oblastí mozku, oboustranně) a odběr krve a CSF.

2. Provést studii na 36ks miniprasat, kterým bude jednorázově stereotakticky (do 2 oblastí mozku, oboustranně) aplikovány testované AAV s kontrastní látkou, které by měly být využity jako léčivo pro terapii onemocnění u lidí. Experiment spočívá v ustájení experimentálních zvířat a monitorování průběhu modelové terapie a odběru vzorků pro analýzu. Budou testovány 3 rozdílné dávky AAV.

Pravděpodobné potenciální přínosy projektu pokusů - jak by mohlo být dosaženo vědeckého pokroku nebo jaký přínos by z něj člověk, zvířata či životní prostředí mohli mít; v příslušných případech rozlišujte mezi krátkodobými (v době trvání projektu) a dlouhodobými přínosy (mohou se projevit až po skončení projektu)

Přínosem budou údaje o účinnosti a biodistribuci léčivé látky v CNS a periferních orgánech na velkém zvířecím modelu, které budou využity v navazujících preklinických a klinických testováních nového typu léčiva (na bázi zinc-finger represorů) na terapii Huntingtonovy nemoci u lidí.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány (např. injekční aplikace, chirurgické zákroky) - uveďte počet těchto postupů a dobu jejich trvání

U všech miniprasat (mimo pilotní studii) zařazených do pokusu bude v sedaci proveden opakovaný odběr CSF a plné krve za účelem stanovení bazálních hodnot sledovaných parametrů, přítomnosti protilátek proti AAV5 a 9. Odběr bude prováděn v anestezii 6, 4 a 2 týdny před stereotaktickou aplikací.

Pod kontrolou magnetické rezonance a po zjištění klíčových koordinát pro zavedení aplikačního katetru do mozkových struktur (nucleus caudatus, putamen, thalamus) bude miniprasatům provedena trepanace frontální kosti a následně zahájena aplikace vektoru pomocí aplikačního katetru a mikropumpy. Aplikace bude oboustranná do dvou až tří míst každé hemisféry, tj 4 -6 míst aplikace na zvíře. Po provedené aplikaci bude kůže v místě bodových trepanací sešita nevstřebatelným materiálem a rána ošetřena plastickým obvazem solutio Novikov.

a. Pilotní skupina – odběr krve a CSF + utracení zvířat v celkové anestezii ve 2 týdnech nebo 12 měsících po stereotaktické aplikaci spojené s celotělovým proplachem ledovým PBS

b. Odběry žilní krve a CSF v intervalech 4 týdny, 3 měsíce, 6 měsíců a 12 měsíců po aplikaci testované látky (hlavní studie). Utracení zvířat v celkové anestezii v 6 nebo 12 měsících spojené s celotělovým proplachem ledovým PBS

Předpokládané dopady / nepříznivé účinky na zvířata (např. bolest, ztráta hmotnosti, nečinnost / snížená hybnost, stres, neobvyklé chování) a doba trvání těchto účinků

Nejsou očekávány závažné nežádoucí účinky u zvířat. Klasifikace závažnosti je střední z důvodu stereotaktické aplikace do mozku v celkové anestezii, injekční sedace za účelem opakovaného odběru žilní krve a CSF lumbální punkcí. Při jakémkoliv zhoršení zdravotního stavu budou zvířatům podána analgetika a v nevyhnutných případech budou bezodkladně utracena. Zvířata budou na konci projektu usmrcena za účelem získání tkání pro biochemické a histologické analýzy.

Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá, a předpokládaná závažnost pokusu					
Druh zvířat ²⁾ - vyberte ze seznamu	Odhadovaný počet	Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti			
		Nenabude vědomí	Mírná	Střední	Závažná
Prase domácí (Sus scrofa domesticus)	44			44	
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					

Nakládání se zvířaty, která nebudou na konci pokusu usmrcena

Odhadovaný počet zvířat k opětovnému použití	2
Odhadovaný počet zvířat, která budou navracena do přírodního stanoviště či systému chovu	0
Odhadovaný počet zvířat k umístění do zájmového chovu	0

Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty - *uved'te*

Jedná se o rezervní jedince, kteří pokud nepodstoupí stereotaktickou aplikaci, mohou být po rekonvalescenci opětovně využiti.

Uplatňování 3R

Nahrazení používání zvířat - *uved'te, jaké alternativy bez použití zvířat jsou v této oblasti dostupné a proč nemohou být použity pro účely tohoto projektu*

K tomu, aby mohly být nové formy léčiv zavedeny do běžné klinické praxe, je nutné provést studii na relevantním velkém experimentálním modelu. Výsledky experimentu na prasati jsou aplikovatelné pro lidské subjekty. Obdobná studie doposud nebyla na miniprasatech provedena. S ohledem na charakter studie (účinnost a bio-distribuce) a nutnou blízkou anatomickou a fyziologickou příbuznost je použití laboratorního zvířete (miniaturní prase) nezbytné a nelze nahradit žádnou alternativní metodou.

Omezení používání zvířat - *vysvětlíte, jaký počet zvířat byl pro tento projekt stanoven. Popište kroky, které byly podniknuty ke snížení počtu používaných zvířat, a zásady použité k vytvoření studie; případně popište postupy, které budou používány po celou dobu trvání projektu za účelem minimalizace počtu používaných zvířat a které odpovídají vědeckým cílům (mezi tyto postupy mohou patřit např. pilotní studie, počítačové modelování, sdílení tkání a opakované použití).*

Ve studii bude použito max 44ks miniprasat. Uvedený počet zvířat je nezbytný pro získání primárních a bio-distribučních dat v závislosti na variabilní odpověď prasat/miniprasat po aplikaci nové formy léčiva pro terapii neurodegenerativního onemocnění u lidí.

Šetrné zacházení se zvířaty - *uved'te příklady konkrétních opatření (např. zvýšené pozorování, pooperační péče, tlumení bolesti, výcvik zvířat) přijatých v souvislosti s postupy k minimalizaci dopadů na dobré životní podmínky zvířat; popište mechanismy k přijímání vznikajících zmírňujících postupů v době trvání projektu*

Aplikace testovaných látek je prováděna v celkové anestezii. Miniprasata jsou držena na hluboké podestýlce. Z důvodu dlouhodobého monitorování zdravotního stavu, případného vývoje onemocnění jedinců bude potřeba opakovaného odběru periferní krve a CSF. Zákroky (stereotaktická aplikace nebo odběry žilní krve a CSF v sedaci) představují opakovaný střední a krátkodobý stress pro zvířata. Při jakémkoliv zhoršení zdravotního stavu budou zvířatům podávána analgetika – Vetalgín, Flunixin nebo Fentanyl (i.m.) nebo budou bezodkladně utracena. Experimenty budou vykonávány v minimální možné míře pro získání primárních farmakokinetických a bio-distribučních dat a především z důvodu nejmenšího možného ovlivnění klinického obrazu experimentálními postupy. Odběry biologického materiálu budou vykonávány v minimální možné míře pro uspokojivé statistické zpracování experimentu.

Použité druhy zvířat - *vysvětlíte výběr druhů a souvisejících životních stadií*

Miniaturní prase bylo zvoleno jako modelový organismus z důvodů fyziologických parametrů podobných člověku.

¹⁾ Včetně vědeckých pojmů, které se mohou skládat z více než pěti jednotlivých slov, a s výjimkou druhů zvířat a účelů uvedených jinde v dokumentu

²⁾ Druhy zvířat v souladu s kategoriemi statistického vykazování v příloze III prováděcího rozhodnutí Komise 2020/569 s doplňkovou možností „nespecifikovaného savce“ pro zachování anonymity ve výjimečných případech