NETECHNICKÉ SHRNUTÍ PROJEKTU POKUSŮ 61/2020
upravené podle PR 2020/569

Název projektu pokusů

GENOVÁ TERAPIE HUNTIGTONOVY NEMOCI – KOMPARATIVNÍ PREKLINICKÁ STUDIE NA TRANSGENNÍCH MINIPRASTECH „ Cisterna Magna“

Doba trvání projektu pokusů - *v měsících*	19 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	
☐	legislativní účely a běžná výroba	kontrola kvality (včetně zkoušení bezpečnosti a účinnosti šarže)
☐		jiné zkoušení účinnosti a tolerance
☐		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*

Cílem je tedy provést studii na 9ks transgenních miniprasat (TGHD), exprimujících N-terminální fragment lidského mutovaného huntingtinu, kterým budou stereotakticky intrastriatálně (obě hemisféry) a/nebo intratekálně aplikovány testované AAV vektory, které jsou již v současné době testovány pro terapii onemocnění u lidí. Experiment spočívá v ustájení experimentálních zvířat a monitorování průběhu modelové terapie a odběru vzorků pro analýzu před a po vlastní aplikaci AAV vektorů.

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 aplikace terapeutika (AAV-miRNA-HTT) bude stanovení efektivity a bio-distribuce terapeutických vektorů a exprimovaných molekul (mHtt, miRNA, reporterové sekvence) v CNS a periferních orgánech v preklinickém experimentu na velkém zvířecím modelu. Budou získána data o snižování huntingtinu (HTT) a mutovaného huntingtinu (mHTT) v mozku a mozkomíšním moku (CSF). Dlouhodobým přínosem tohoto klinického testování může být klinické využií nové genové terapie v léčbě Huntingtonovy nemoci lidí.

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

U každého prasete bude proveden opakovaný odběr CSF a plné krve za účelem stanovení bazálních hodnot sledovaných parametrů, přítomnosti protilátek proti AVV5. Odběr bude prováděn v anestezii 1 měsíc, 14 dní před a v den intrastriatální stereotaktické a/nebo intratekální aplikace. V den aplikace bude zvířatům v celkové anestezii stereotakticky injikována suspenze AAV5 vektorů do bazálních ganglií a/nebo intratekálně do oblasti cisterna magna, Kontrolním zvířatům nebude podán žádný AAV konstrukt a bude se jim odebírat jenom krev a CSF v těch samých intervalech jako u dvou pokusných skupin. Po aplikaci bude monitorována exprese mHtt v CSF a krvi. Budou odebírány vzorky plné krve a CSF v 2 měsíčních intervalech až do 6 měsíců po aplikaci vektorů. Pokus bude ukončen usmrcením všech zvířat 6 měsíců po aplikaci AAV konstruktů předávkováním anestetikem

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

Nejsou očekávány žádné dlouhodobě středně závažné nežádoucí účinky u zvířat. Klasifikace závažnosti je střední z důvodu stereotaktické intrastriatální/intratekální aplikace v celkové anestezii, injekční sedace za účelem opakovaného odběru žilní krve a CSF lumbální punkcí. 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**

	Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti

Druh zvířat [2]) *- vyberte ze seznamu*	Odhado-vaný počet	Nenabude vědomí	Mírná	Střední	Závažná
Prase domácí (Sus scrofa domesticus)	11			11	
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					
Zvolte položku.					

Nakládání se zvířaty, která nebudou na konci pokusu usmrcena	
Odhadovaný počet zvířat k opětovnému použití	0
Odhadovaný počet zvířat, která budou navrácena do přírodního stanoviště či systému chovu	0
Odhadovaný počet zvířat k umístění do zájmového chovu	0

Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty - *uveďte*

-

Uplatňování 3R

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

Výsledky experimentu na praseti 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 - *vysvětlete, 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 9 + 2ks miniprasat. Uvedený počet zvířat (3ks/skupina) + 2ks rezerva představuje minimum pro získání primárních a bio-distribučních dat a variabilní odpověď prasat/miniprasat po aplikaci nové formy léčiva pro terapii neurodegenerativního onemocnění u lidí.

Šetrné zacházení se zvířaty - *uveďte 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*

Stereotaktická intrastriatální/intratekální aplikace je prováděna v celkové anestezii. Miniprasata jsou držena na hluboké podestýlce. 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. Veterinární zákroky (odběry žilní krve a CSF, sedace) představují opakovaný střední a krátkodobý stress pro zvířata. Při jakémkoliv zhoršení zdravotního stavu budou zvířatům podávána analgetika – Vetalgin, Flunixin, Tramal nebo Fentanyl (i.m.) nebo budou bezodkladně utracena.

Použité druhy zvířat - *vysvětlete 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