

## Netechnické zhrnutie projektu

### Názov projektu:

### Vývoj testu na monitorovanie účinnosti vakcíny-potency assay 2

**Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):** imunizácia, dávka imunogénu, Alzheimerova choroba, účinnosť vakcíny

**Účel projektu:** Základný výskum

### Podrobný účel postupu:

Projekt je zameraný na vývoj testu (tzv. potency assay), ktorý bude monitorovať integritu (konzistentnosť, stabilitu, kvalitu) a účinnosť (imunogenicitu) peptidovej vakcíny určenej na klinické testovanie. Peptidová vakcína pozostáva z krátkeho syntetického peptidu a nosiča. Podľa nariadení regulačných orgánov EU (EU: Directive 75/318/EEC as amended, jul 1996; ICH: QUALITY OF BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTS: STABILITY TESTING OF BIOTECHNOLOGICAL/BIOLOGICAL PRODUCTS (Q5C), potency assay monitorujúca kompaktnosť vakcíny musí byť schopná odraziť aj minimálne poškodenie vakcíny, tj. zníženie účinnosť (imunogenicitu). Z tohto dôvodu budeme na jednej strane testovať tri riedenia vakcíny (4x, 10x, 40x), ktoré budú simulovať rôzny stupeň možnej degradácie vakcíny. Na druhej strane budeme analyzovať vplyv cieľeného „arteficiálneho“ poškodenia vakcíny (napr. tepelne opracovaná vakcína, mechanicky narušená vakcína) na vývoj hladín protilátok. Takto opracované experimentálne vakcíny budeme porovnávať s kontrolnou intaktnou vakcínou (interný štandard). Ako interný štandard nám bude slúžiť vakcína stabilizovaná 50% glycerolom pri teplote -80°C.

Test bude v prvom kroku spočívať v *in vivo* experimente, tj. na imunizácii myší jednak vakcínami rôznej sily (rôznymi riedeniami vakcíny) a jednak cielene poškodenými vakcínami. Druhá časť, *in vitro* experiment, bude založená na analýze kinetiky tvorby protilátok. Po podaní jednej dávky vakcíny budeme experimentálnym zvieratám v dvojtýždňových intervaloch (tj. 2, 4 a 6 týždňov po podaní vakcíny) odoberať krv a sledovať hladiny indukovaných protilátok.

Projekt prebehne v čiastkových experimentoch: 25 experimentov, 10 zvierat v experimente. Celkom bude použitých 250 myší C57BL/6NCr1 (samice) vo veku približne 6 týždňov. Po vstupnej karanténe a veterinárnom vyšetrení budú zvieratá priradené do príslušného experimentu.

- V deň 1 sa každej myške v experimente aplikuje testovaný imunogén subkutánnou injekciou v dávke 300 µl.
- V deň 14, 28, 42 sa odoberie krv z retroorbitálneho plexu v objeme asi 100-150 µl. Celkový objem odobratej krvi od každého zvieratá neprekračuje stanovené normy.
- Po poslednom odbere budú zvieratá z experimentu vyradené a humánne usmrtené v súlade so zákonom: anestézia a dislokácia krčných stavcov.

### Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Preštudovali sme všetky dostupné alternatívne prístupy, ktoré by umožnili v danom experimente nahradiť zvieratá za iný biologický testovací systém. Keďže kvalitu vakcíny (jej biologickú aktivitu) najkomplexnejšie odráža jej schopnosť indukovať imunitnú odpoveď, na monitorovanie konzistentnosti a efektívnosti vakcíny je nevyhnutné použiť imunitný systém zvierat. Pokusy sú navrhnuté v súlade s legislatívnymi a etickými normami, ktoré sa vzťahujú na prácu s laboratórnymi zvieratami.

### Druhy a počty použitých zvierat v pokuse:

Celkovo bude použitých 250 myší C57BL/6NCr1 (samice) vo veku približne 6 týždňov.

**Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu:**

Zvieratám bude jednorazovo subkutánne aplikovaný imunogén, a následne 3x v 2-týždňových intervaloch odobratá krv v miernej sedácii z retroorbitálneho plexu. Po poslednom odbere budú zvieratá humane usmrtené v celkovej anestézii dislokáciou krčných stavcov.

Zvieratá po subkutánnej injekcii, a tiež pri odbere krvi sú monitorované a v prípade neadekvátnej reakcie ako nar. výrazná triaška, apatia a pod. sa upovedomí veterinárny lekár a vedúci experimentu a po posúdení zdravotného stavu sa rozhodne o human end point:

**Human end point:**

	Prejav	Skóre			
		0	1	2	3
1	Akýkoľvek stav vedúci k dlhotrvajúcej alebo nezvratnej neschopnosti prijímať potravu alebo vodu (dlhodobá nehybnosť, letargia...)	0	1	2	3
2	Stavy, ktoré poukazujú na silnú bolesť, strach alebo utrpenie (autoindukovaná trauma, hrbenie, vokalizácia, abnormálne pohyby, otvorené rany,...)	0	1	2	3
3	Rýchla alebo pretrvávajúca strata hmotnosti (>15% očakávanej hmotnosti)	0	1	2	3
4	Zovšeobecnené zníženie starostlivosti a abnormálny vzhľad počas dlhého časového obdobia (naježená srst', rozsiahla alopecie,...)	0	1	2	3
5	Ťažké alebo pretrvávajúce ťažkosti s dýchaním	0	1	2	3

Hodnotenie:

0 - bez príznakov

1 - mierny príznak

2- stredne silný príznak / konzultácia s veterinárnym lekárom

3- silný príznak -eutanázia

Každý znak sa zhodnotí na základe bodovania 0-3, pričom 0-bez príznakov, 3- silný príznak.

Výsledné skóre je súčtom jednotlivých pozorovaných príznakov.

Každé zviera, ktoré bude prejavovať stredne silný príznak bude presunuté do kletky s neobmedzeným prístupom ku krmivu a tekutinám, bude neustále monitorované a jeho stav bude konzultovaný veterinárnym lekárom. Každé zviera prejavujúce silný príznak v ktoromkoľvek prejave, prípadne pri súčte bodov viac ako 8, bude vyradené z experimentu a humane usmrtené.

**Manipulácia so zvieratami:**

Tetovanie chvosta – stredná

Krátkodobá fixácia a subkutánna injekcia (jedna dávka)-slabá

Stav zvierat po aplikácii – slabá

Odber krvi (3x v dvojtýždňových intervaloch/retroorbitálny plexus)-stredná

Stav zvierat počas obdobia prežívania – slabá až stredná

Usmrtenie v anestézii dislokáciou krčných stavcov - slabá

**Zohľadnenie 3R****Zjemnenie:**

Pri manipulácii so zvieratami sa budú dodržiavať interné predpisy. So zvieratami sa bude zaobchádzať humane a nebude sa im vyvíjať prebytočný stres. Niekoľko nezávislých štúdií preukázalo, že stres významne modifikuje imunitnú odpoveď, čo je v prípade nášho experimentu nežiaduce. Starostlivosť zabezpečuje jedna osoba, na ktorú si zvieratá zvykli. Zvieratá sú chované v počte 5 zvierat na chovnú nádobu, aby sme zabezpečili sociálne interakcie medzi zvieratami. Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich fyziologickým a sociologickým potrebám. Odber krvi sa vykonáva v čiastkovej anestézii, aby sme utlmili bolesť spôsobenú odberom krvi.

Pri pozorovaní nežiadúcich účinkov (triaška, apatia, ...), zviera oddelíme a kletku umiestnime na výhrevnú podložku až do zotavenia. V prípade vytvorenia rán v mieste vpichu ranu ošetríme prípravkom Betadine a v nasledujúcich dňoch pozorujeme. V prípade výskytu neočakávaných

mokvajúcich rán, miesto vpichu ošetríme dermálnou masťou Kalcium Panthotenicum a izolujeme, aby sme zabránili ďalšiemu poraneniu zvierat a ostatnými zvieratami. **Pravidelne je kontrolovaný zdravotný stav zvierat a hodnotené bodové skóre podľa tabuľky human end point.**

**Redukcia:**

Stanovený počet zvierat je minimalizovaný v čo najvyššej možnej miere a zároveň zabezpečujúci štatistickú relevantnosť dosiahnutých výsledkov.

**Nahradenie:**

Súčasná úroveň vedeckého poznania neumožňuje sledovať integritu (konzistentnosť, stabilitu, kvalitu) a účinnosť (imunogenicitu) vakcíny v in vitro podmienkach. Po imunizácii sa sleduje celková hladina vakcínou indukovaných protilátok. Z legislatívneho hľadiska nie je možné daný experiment vykonávať na ľudských pacientoch.

**Zásada nahraditeľnosti zvierat**

Pre hľadanie alternatívnej metódy sme použili nasledovné registre medzinárodne overených a uznaných alternatívnych metód (ECVAM, NICEATM-ICCVAM, NC3Rs, AltTox), kde sme nenašli žiadnu alternatívnu metódu, ktorú by sme mohli použiť vo svojom projekte, aby sme nemuseli vykonávať experimenty na zvieratách.

**Utrpenie versus prínos**

Zvieratá v danom experimente nebudú vystavené nadmernému utrpeniu. Zo skúsenosti z našich predchádzajúcich projektov neočakávame nepriaznivé účinky na zvieratá. U niektorých zvierat však môže v krátkom čase po vpichu objaviť mierna apatia v dôsledku stresu z aplikácie subkutánnej injekcie, ktorá odznie v nasledujúcich hodinách. Subkutánna aplikácia trvá niekoľko sekúnd. Odber krvi trvá len pár sekúnd a vykonáva sa na sedovaných zvieratách. Zvieratá dostanú jednu nízku dávku netoxického vakcíny, ktorá indukuje len miernu imunitnú odpoveď a nevedie k poškodeniu organizmu. Keďže príčina Alzheimerovej choroby zostáva neznáma a stále neexistuje účinná terapia, prínos projektu spočíva vo vývoji testu (potency assay) na monitorovanie komplexnosti, stability a účinnosti (biologickej aktivity) vakcíny pre pacientov trpiacich Alzheimerovou chorobou.

Začiatok pokusu je plánovaný na **14.4.2020** a bude sa realizovať do 31.12.2022.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

Projekt nevyžaduje spätné posúdenie (podľa Nariadenia vlády SR č. 377/2012 Z.z.).