

**NETECHNICKÉ SHRnutí PROJEKTU POKUSŮ**

<b>Název projektu pokusů</b>	
<b>Vývoj a testování preventivních a terapeutických vakcín na bázi rekombinantních proteinů, RNA a DNA.</b>	
Doba trvání projektu pokusů	do 04. 09. 2022
Klíčová slova - <i>maximálně 5</i>	HIV-1, Borrelie, Influenza, Candida, rekombinantní protein, RNA, DNA, liposom
<b>Účel projektu pokusů - označte jej křížkem (x) do prázdného políčka</b>	
<input checked="" type="checkbox"/>	základní výzkum
<input type="checkbox"/>	translační nebo aplikovaný výzkum
<input type="checkbox"/>	vývoj, výroba nebo zkoušení kvality, účinnosti a nezávadnosti léčiv, potravin, krmiv a jiných látek nebo výrobků
<input type="checkbox"/>	ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví a dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat
<input type="checkbox"/>	zachování druhů
<input type="checkbox"/>	vyšší vzdělávání nebo odborná příprava
<input type="checkbox"/>	trestní řízení a jiné soudní řízení
<b>Cíle projektu pokusů (např. řešené vědecké neznámé nebo vědecké či klinické potřeby)</b>	
<ol style="list-style-type: none"> <li>Ověřit imunogenicitu proteinových antigenních konstruktů připravených rekombinantní technologií.</li> <li>Ověřit imunogenicitu RNA a DNA vakcinačních konstruktů</li> <li>Charakterizovat vazné a neutralizační protilátky a parametry specifické a přirozené buněčné imunity.</li> </ol>	
<b>Pravděpodobné potenciální přínosy projektu pokusů (jak by mohlo být dosaženo pokroku ve vašem vědním oboru nebo jaký přínos by z něj člověk či zvířata mohli mít)</b>	
<p>Navržené experimenty přispějí k rozšíření poznatků o možnosti indukce antigenně specifické imunitní odpovědi mimikující odpověď jedinců rezistentních k dané virové či bakteriální infekci mediovanou specifickými neutralizačními komplement aktivujícími nebo opsonizačními protilátkami. Obecná překážka efektivní imunizace vůči antigenním glykopeptidům a glykanům virů a polysacharidům bakterií a některým obalovým bakteriálním proteinům spočívá ve slabé imunogenicitě některých mikrobiálních struktur a jejich vnitrodruhové variabilitě. Využití technologie vysokoafinitních proteinových ligandů, jako mimotopů vážících paratop dané specifické protilátky, připravených skríníngem randomizovaných knihoven a následně rekombinantní technologií pro imunizační účely včetně fúzování antigenů, nabízí cestu efektivní indukce tvorby vysoce specifických neutralizačních, opsonizačních, nebo komplement aktivujících protilátek. Tato cesta představuje jeden z velmi slibných nástrojů k designu budoucí protektivní široce efektivní vakcíny proti HIV-1, chřipce, ale i bakteriálním a mykotickým patogenům, u nichž byly (nejčastěji v populaci jedinců rezistentních na danou infekci či na její opakované vzplanutí) identifikovány a izolovány protektivní protilátky.</p>	
<b>Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá</b>	
<p>Myši, 18-22 g, 800 ks          Morčata, 300-450 g, 150 ks</p>	
Jaké jsou očekávané nežádoucí účinky u zvířat? Jaká je navrhovaná míra závažnosti? Jak bude se zvířaty naloženo po skončení pokusu?	
<p>Používané vakcinační postupy vyvolávají pouze lokální projevy spočívající v mírném zatvrdnutí v místě vpichu případně v lehké ulceraci při intradermální aplikaci. Dosavadní experimenty s analogicky koncipovanými imunizačními postupy nevykázaly žádné jiné nežádoucí známky (Knotigova et al., Pharm Res. 2015 32(4):1186-99; Krupka et al., J Control Release. 2012 Jun 10;160(2):374-81; Raska et al., Vaccine. 2008 26(12):1541-51). Po skončení pokusu bude likvidace kadaverů zvířat probíhat v zařízení SITA CZ a. s.</p>	
<b>Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)</b>	
Nahrazení používání zvířat: Uveďte, proč je nutné použít zvířata a proč nemohou být využity alternativy bez použití zvířat.	
<p>Nahrazení zvířat (Replacement)          Imunizační experiment na zvířeti je nezbytný, neboť neexistuje žádný adekvátní <i>in vitro</i> model umožňující spolehlivě předpovědět kvalitu a intenzitu imunitní odpovědi.</p>	
Omezení používání zvířat: Vysvětlete, jak lze zajistit použití co nejmenšího počtu zvířat.	
<p>Celkový plán počtu použitých pokusných zvířat je stanoven s ohledem na rozsah imunizačních experimentů (nutnost testování vybraných rekombinantních antigenů, DNA a RNA v kombinaci s již dříve otestovanými a ověřenými adjuvans (Alum, NorAbuMDP; Knotigova et al., Pharm Res. 2015 32(4):1186-99) a v kombinaci s biokompatibilními proteoliposomálními nosiči, nutnost zahrnout kontrolní skupiny (první skupině nebude podán antigen, ale pouze adjuvans a druhé skupině bude podán antigen bez adjuvans) a nutnost opakování vybraných experimentů z důvodu ověření statistické významnosti zjištěných imunologických parametrů v nezávisle provedených experimentech. Minimální počet 5 až 10 zvířat na jednu skupinu je určen ze standardní deviace a průměrných hodnot titru specifických a neutralizačních protilátek naměřených v předchozích analogických experimentech a při použití t-testu a hodnotě prahu významnosti 0,05. Budou použity inbrední linie myši, čím se zabezpečí snížení genetické variability a maximální homozygotnost zvířat, a tím se sníží počet zvířat nezbytný pro daný pokus. Zvířata budou v SPF kvalitě a tím se zabezpečí snížení rizika modifikace výsledků v důsledku onemocnění. Imunizace experimentálních morčat bude provedena pouze u vybraných rekombinantních antigenů, které při imunizaci experimentálních myši vykážou nejvyšší titry specifických či nejvyšší aktivitu neutralizačních či komplement aktivujících protilátek.</p>	
Šetrné zacházení se zvířaty: Vysvětlete volbu druhu zvířat a proč se v případě tohoto zvířecího modelu jedná o nejšetrnější	

použití z hlediska vědeckých cílů.

Vysvětlete obecná opatření, která budou přijata za účelem snížení újmy způsobené zvířatům na minimum.

S laboratorními zvířaty se nakládá dle pravidel uvedených v zákonu č. ~~359/2012~~ a vyhlášce č. 419/2012, kde je jasně vymezen způsob o nakládání s laboratorními zvířaty. Jednotlivé experimentální pokusy - imunizace a odběr biologických vzorků jsou jen mírné bolestivé zákroky a tyto budou prováděny podle standardů práce s laboratorními zvířaty. Žádné jiné zákroky nebudou na zvířatech prováděny. Terminální odběr krve a sleziny u vybraných skupin bude proveden v celkové anestezii. Zvířata budou denně monitorována veterinárním lékařem a nebudou cíleně vystavené utrpení. V případě trvalého poškození zdravotního stavu myši v průběhu pokusu bude zvíře humánně utraceno.