

OBRAZAC 3

Naslov projekta	„Biologija virusa u razvoju novih cjepiva“ Znanstveni centar izvrsnosti za virusnu imunologiju i cjepiva (CERVirVac) (2014-2019) – dva radna paketa pod nazivom: 1. Biologija virusa mumpsa: Racionalni dizajn živog atenuiranog cjepiva protiv mumpsa i virusa mumpsa kao vektora za druga cjepiva i 2. Optimizacija proizvodnje virusnih cjepiva i razvoj novih istraživačkih alata		
Trajanje projekta	4 godine		
Ključne riječi (najviše do 5)	neurovirulencija virusa, cjepiva, poliklonska i monoklonska antitijela		
	Svrha projekta (kao u članku 5. Pravilnika):		
	Temeljno istraživanje	da	ne
	Translacijska i primijenjena istraživanja	da	ne
	Korištenje određeno propisima i rutinska proizvodnja	da	ne
	Zaštita prirodnog okoliša u interesu zdravlja ili dobrobiti čovjeka ili životinje	da	ne
	Očuvanje vrste	da	ne
	Visoko obrazovanje ili osposobljavanje	da	ne
	Forenzička ispitivanja	da	ne
	Održavanje kolonije genetski izmijenjenih životinja koje se ne koriste u drugim postupcima	da	ne
Opišite ciljeve projekta (na primjer, znanstvene nepoznanice ili znanstvene ili kliničke potrebe).	Konačni cilj istraživanja (1. radni paket) je identifikacija soja virusa mumpsa koji bi svojim biološkim i imunološkim karakteristikama odgovarao kao kandidat za razvoj novog atenuiranog cjepiva protiv mumpsa. Kako bi soj postao kandidat za novo cjepivo nužno je u <i>in vivo</i> modelima istražiti njegovu imunogeničnost i neškodljivost, te utjecaj samog soja virusa na tkiva i organe zaraženih životinja. Zbog svoje neurotropnosti i posljedične neurovirulentnosti virusa mumpsa svaki proizvođač živog atenuiranog cjepiva protiv mumpsa mora ispitati neurovirulentnost svog cjepnog soja. Nadalje, cilj je (2. drugi radni paket) istražiti učinkoviti postupak pročišćavanja virusnih čestica sačuvane infektivnosti iz virusnih suspenzija uzgojenih u kulturi stanica. U dosadašnjim istraživanjima izumili smo novi postupak pročišćavanja virusa imunoafinitetnom kromatografijom (patentna prijava HR P20160086A), u kojemu smo koristili poliklonska antitijela specifična za virus mumpsa i učinkovita u njegovoj neutralizaciji, i pripremljena u sklopu ranijih projekata. Cilj je povećati učinkovitost izumljenog postupka korištenjem monoklonskih antitijela specifičnih samo za površinske antigene virusa.		
Koje su potencijalne prednosti za koje je vjerojatno da proizlaze iz ovog projekta (kako znanost može biti unaprijeđena ili kako ljudi ili životinje mogu imati koristi od projekta).	Znanstveni doprinos ovog istraživanja je pronalazak mehanizama racionalnog pristupa u smanjenju viruse patogenosti u cilju dobivanja funkcionalne metode atenuacije cjepnih sojeva virusa koja bi bila primjenjiva na sva cjepiva. Metode proizvodnje monoklonskih i poliklonskih antitijela spadaju u rutinsku proizvodnju istraživačkih alata. Rezultati ovog istraživanja predstavljaju doprinos postupcima pročišćavanja virusa u proizvodnji virusnih cjepiva i virusnih vektora za gensku terapiju, koji posljedično mogu dovesti do stvaranja sigurnijih cjepiva i terapeutika na bazi virusa uz manje troškove, te ih učiniti dostupnijima ljudskoj populaciji.		

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	Broj i vrsta životinja koji će se koristiti u testiranjima po vrstama je sljedeći: 1. zamorčici (zamorčica soja CRL: (HA)BR) – 200 2. štakori (soja LEW/SsNHsd) – 500 3. miševi (soja NIH Ola/Hsd) - 100
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Pokusi neurovirulencije i ispitivanja imunogeničnosti koji se izvode klasificiraju se kao teški s obzirom da intervencija u životinja može trajno oštetiti stanje životinja i uzrokovati progresivnu bolest povezanu s oštećenjem fiziološkog stanja organizma. Pokusi imunizacije životinja radi dobivanja monoklonskih i poliklonskih antitijela klasificiraju se kao umjereni.
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	Ispitivanje ima za cilj istražiti histološke promjene u mozgu kao posljedica neurotropnog s posljedičnim neurovirulentnim svojstvima različitih sojeva virusa mumpsa. Zbog navedenog nije moguća zamjena životinja modelima izoliranih organa, kompjutorskim simulacijama ili drugim metodama. Ovaj pokusni model napravljen je u okviru kolaborativne studije u cilju zamjene primata (eng. <i>rat-based neurovirulence testing</i>) u ovoj vrsti testiranja, pa je već sam po sebi test zamjene. Kod proizvodnje monoklonskih antitijela pokus je dizajniran na način da se imunizacijom životinje potiče proizvodnja specifičnog B-limfocitnog klona antigenom koji će biti maksimalno pročišćen, a kasnija izolacija i spajanje u hibridom obaviti će se <i>in vitro</i> tehnikama. Uzgoj hibridoma i produkcija monoklonskih antitijela također se nastavlja <i>in vitro</i> tehnikama.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	Za svaki pokus izračunat je minimalni broj životinja koji daje prihvatljivu statističku snagu, temeljem prethodnih istraživanja. Na taj način osigurava se korištenje minimalnog broja životinja koji jamči snagu studije i pouzdanost dobivenih rezultata, a bez potrebe za ponavljanjem pokusa.
3. Poboljšanje Objasniti izbor vrsta i zašto su korišteni životinjski modeli primjereniji od drugih, uzimajući u obzir znanstvene ciljeve. Objasniti opće mjere koje će se poduzeti kako bi se smanjile štete za životinje.	Odabrane životinjske vrste već se i koriste kao rezultat istraživanja na zamjenskim modelima (štakorski model neurovirulencije zamjenski je model za primata, dok se shema koja će se koristiti za proizvodnju monoklonskih antitijela koristi minimalni broj miševa za produkciju specifičnog B limfocitnog klona dok će se daljnja proizvodnja Mab provoditi <i>in vitro</i>). Štakor i zamorčić koje će se koristiti za testiranje imunogeničnosti odabrani su kao životinjske vrste koje će kao krajnji produkt dati dovoljnu količinu imunog seruma koja će biti dostatna za provođenje danjih <i>in vitro</i> testiranja. Ovi životinjski modeli zamijenili su mišji model u kojem je bilo nemoguće odrediti testne točke (kontrola imunog seruma nakon imunizacija) bez žrtvovanja grupe životinja u kontrolnoj točki. Odabirom veće životinjske vrste moguće je dobiti pokusni uzorak krvi u dostatnoj količini za analize, a po završetku pokusa dobiti dovoljnu količinu imunog seruma za analize. Monoklonska antitijela specifična za viruse mumpsa i ospice postoje i komercijalno su dostupna, no nisu dovoljno karakterizirana, nije definirana njihova specifičnost (nije jasno da li su specifična za površinski antigena, ili za neki drugi antigen), nije poznato da li su funkcionalna. U svrhu razvoja imunoafinitetnih postupaka pročišćavanja virusa iz kompleksnih suspenzija, nužno je imati antitijela specifična za površinske antigene u nativnoj formi, onakve kakva se nalazi na površini infektivnog virusa, nužno je da su ta antitijela neutralizirajuća, te je nužno da jednom proizvedeno i karakterizirano antitijela zadovoljavajuće kvalitete za ova istraživanja možemo kontrolirano i stalno pripravljeti u dovoljnoj količini.