

NETECHNICKÉ SHRnutí PROJEKTU POKUSŮ

Název projektu pokusů	
Vliv změny formulace na biologickou dostupnost známé léčivé látky	
Doba trvání projektu pokusů	červen 2018 - duben 2021
Klíčová slova - <i>maximálně 5</i>	léčivá látka, formulace, biologická dostupnost, farmakokinetika, laboratorní zvířata
Účel projektu pokusů - označte jej křížkem (x) do prázdného políčka	
<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
Cíle projektu pokusů (např. řešené vědecké neznámé nebo vědecké či klinické potřeby)	
Cílem tohoto výzkumného projektu bude stanovit vliv změny formulace na biologickou dostupnost a farmakokinetiku (vstřebávání a pohyb léčiva v organismu) již klinicky používané léčivé látky (API, active pharmaceutical ingredient) po perorálním podání laboratorním zvířatům v běžném nebo ve zkříženém (cross-over) uspořádání studie.	
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)	
Pokud bude prokázán výhodný farmakokinetický profil zde zkoumaných formulací, mohou být perspektivně využity pro úpravu dalších léčivých látek a/nebo přípravu/výrobu odvozených humánních léčiv obsahující novou formulaci dané API za účelem optimalizace dávkování a bezpečnosti podávání konkrétního léčiva.	
Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá	
Budeme užívat buď dospělé konvenční laboratorní potkany kmene Wistar (samci, hmotnost 200-350 g, stáří minimálně 8 týdnů) nebo myši kmenů C57BL/6J, BALB/c nebo CD-1 vždy jednoho pohlaví (hmotnost 25-40 g, věk minimálně 7 týdnů), kteří/teré jsou dle literatury vhodné pro farmakokinetické studie. Ročně plánujeme využít maximálně 200 ks potkanů a/nebo 200 ks myši k výše popsaným experimentálním účelům.	
Jaké jsou očekávané nežádoucí účinky u zvířat? Jaká je navrhovaná míra závažnosti? Jak bude se zvířaty naloženo po skončení pokusu?	
Dávky API budou voleny tak, aby odpovídaly buď terapeutickým dávkám referenční („známé“ / klinicky používané) API obvyklým při podávání u lidí, event. takovým, které byly použity v odpovídajících experimentálních farmakokinetických studiích s referenční API a nevykazují toxické účinky na pokusná zvířata. Míra závažnosti:	
<ul style="list-style-type: none"> - Myši po jednorázovém odběru krve v celkové anestézii již nenabudou vědomí. - Mírná závažnost pokusů se předpokládá pro jednorázové podání látky žaludeční sondou tzv. gaváží u myši a potkanů; dále jen pro potkany: opakované odběry krve ocasní kanylou nebo přímou venepunkcí v celkovém množství nepřesahující 10% objemu krve v oběhu, event. s přechodným omezením příjmu potravy (do 24 hodin) a pohybu (několik minut), samostatné umístění potkanů v době trvání experimentu. - Střední: Pro potkany podstupující operační chirurgický zákrok v celkové anestézii se zavedením jugulární nebo arteriální kanyly na dobu maximálně 11 dní spojené s jednorázovým či opakovaným (max. 3krát) podáním různých formulací látky s opakovanými odběry mírně přesahující 10% objemu krve v oběhu s doplněním objemu. 	
Zvířata budou po ukončení pokusů usmrcena předávkováním celkovým inhalačním anestetikem (potkani diethyletherem, myši isofluranem) a zajišťujícím přetětím míchy v úrovni krčních obratlů. Kadavery budou odvezeny k likvidaci certifikovanou firmou.	
Uplatňování 3R (replacement, reduction, refinement)	
Nahrazení používání zvířat: Uveďte, proč je nutné použít zvířata a proč nemohou být využity alternativy bez použití zvířat.	
Vzhledem k charakteru plánovaného <i>in vivo</i> experimentu, tj. aplikace API laboratorním zvířatům s následným srovnáním biologické dostupnosti (tj. frakce podaného léčiva, která se dostane do systémového krevního řečiště) studované a referenční formulace API s nutností odběru krevních vzorků, nemá tento experiment jinou alternativu. Přesto budou vhodné formulace API vybírány s ohledem na výsledky předcházejících <i>in vitro</i> experimentů, které se zaměřují na stanovení fyzikálně-chemických vlastností (např. snadné rozpouštění/přesycení a inhibice srážení aj.) nových formulací API predikujících jejich farmakokinetické parametry <i>in vivo</i> (např. přestup API přes biologické membrány). To zamezí zbytečnému <i>in vivo</i> testování „neperspektivních“ formulací API. Tuto skutečnost jsme ověřili také v databázi validovaných alternativních metod schválených a přijatých Evropskou společností pro alternativní metody (ECVAM).	
Omezení používání zvířat: Vysvětlete, jak lze zajistit použití co nejmenšího počtu zvířat.	
Bude použit minimální počet myši a potkanů zajišťující statistickou významnost pokusu, a to na základě řady literárních údajů. Dvoufázové a třífázové zkřížené (cross-over) farmakokinetické studie (tj. původní skupina potkanů zařazená do kontrolní/referenční skupiny bude zařazená do skupiny s novou formulací API A a/nebo B, a naopak) umožní minimalizovat počet zvířat zařazených do experimentu. Minimální počet potkanů ve skupině byl stanoven na 5 ks v 1	

skupině dle referenčních studií (1,2). V případě myší, vzhledem k nutnosti usmrcení zvířat v každém časovém bodě, byl stanoven nejnižší, ještě pro statistické účely hodnotitelný, počet myší 3 ks pro jeden časový interval v jedné skupině (3). Potkani a myši budou průběžně nakupováni v co nejnižším počtu pouze pro účely daného pokusu, proto výše uvedený roční počet zvířat je maximální a lze předpokládat menší množství použitých zvířat (především v průběhu prvního roku).

(1) Aghazadeh-Habashi A1, Sattari S, Pasutto F, Jamali F. (2002). Single dose pharmacokinetics and bioavailability of glucosamine in the rat. *J Pharm Pharm Sci.* 2002 May-Aug;5(2):181-4.

(2) Joseph W. Lubach et al. (2013) *Mol. Pharmaceutics*, 10, 3997–4004; dx.doi.org/10.1021/mp400283j |

(3) Binfeng Xia et al. (2012) *Biopharm. Drug Dispos.* 33: 536–549 (wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/bdd.1821

Šetrné zacházení se zvířaty: Vysvětlíte volbu druhu zvířat a proč se v případě tohoto zvířecího modelu jedná o nejšetrnější použití z hlediska vědeckých cílů.

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

S ohledem na aplikovanou lékovou formu (roztok, kapsle), farmakogenetické ukazatele, minimální objem krevních vzorků a požadovaný počet odběrů pro porovnávání biologické dostupnosti zformulované a referenční API budeme užívat buď dospělé konvenční laboratorní potkany outbredního kmene Wistar (samci, hmotnost 200-350 g, stáří minimálně 8 týdnů) nebo myši inbredních kmenů C57BL/6J, BALB/c nebo outbredního kmene CD-1 jednoho pohlaví (hmotnost 25-40 g, věk minimálně 7 týdnů), kteří/ktelé jsou dle literatury (např. 1-3 viz výše) vhodné pro farmakokinetické studie.

Se zvířaty bude zacházeno co nejšetrněji dle zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání. O pokusná zvířata bude pečovat osoba způsobilá k této práci.

Experimenty budou prováděny v akreditovaném zvířetníku v souladu se zákonem a s ohledem na maximální welfare zvířat. Potkani a myši budou chováni ve standardních konvenčních podmínkách v odpovídajících klecích v počtu max. 3 zvířata na klec (voda a potrava *ad libitum*, pravidelná výměna podestýlky, atd.) a budou denně kontrolovány. Před zákrokem v celkové anestézii a po ní bude potkanům odebrána potrava na maximálně 8 hodin, přístup k vodě nebude omezen. Pouze na dobu odběru krve (několik minut) budou potkani omezeni v pohybu pomocí standardního „restraineru“ určenému k užití pro potkany v závislosti na tělesné hmotnosti. Na tento krátkodobý imobilizační stres budou potkani postupně habituováni ještě před zahájením experimentu. Po chirurgickém výkonu až do ukončení odběrů krve budou potkani ponecháni odděleni / jednotlivě v klecích, aby nedocházelo k vzájemnému napadání a poškozování zavedených kanyl. Potkani budou pooperačně pozorováni v intervalech 2 hodiny po dobu alespoň 4 hodin nebo dokud nebudou patrné žádné známky bolesti a pak jednou denně. Při bolestivých projevech bude aplikován lék tlumící bolest. V případě neuspokojivého zdravotního stavu zvířete bude pokus ukončen a zvíře usmrceno. Myši po anestézii s odběrem většího množství krve již nenabudou vědomí. Se zvířaty bude zacházeno co nejšetrněji dle zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání. O pokusná zvířata bude pečovat osoba způsobilá k této práci.