

Modele badań równoważności biologicznej na przykładzie trimetazydyny

Anna Kamińska, Jacek Owczarek, Irena Wejman, Daria Orszulak-Michalak

Zakład Biofarmacji, Katedra Biofarmacji, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Adres do korespondencji: Anna Kamińska, Zakład Biofarmacji UM w Łodzi, ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź, tel. 042 677 91 20, e-mail: anna.kaminska@umed.lodz.pl

Dopuszczenie do obrotu produktu leczniczego wymaga szczegółowej dokumentacji dotyczącej jakości, skuteczności i bezpieczeństwa stosowania. Najszerze wymagania dotyczą produktów leczniczych po raz pierwszy wprowadzanych do leczenia (oryginalnych). Dokumentacja takich produktów musi zawierać dane chemiczno-farmaceutyczne oraz wyniki badań farmakologicznych, toksykologicznych i klinicznych. Jednym z elementów dokumentacji klinicznej są dane dotyczące dostępności biologicznej substancji czynnej z danej postaci farmaceutycznej. Badanie dostępności biologicznej wymagane jest dla leków stosowanych doustnie lub innymi drogami, jeżeli ich efekt terapeutyczny uwarunkowany jest osiągnięciem odpowiedniego stężenia we krwi.

Nieco inne są wymagania stawiane produktom leczniczym – odpowiednikom leków oryginalnych (*generic medicinal product*). Nie są konieczne badania farmakologiczno-toksykologiczne oraz kliniczne, poza porównaniem dostępności biologicznej. Porównywalna dostępność biologiczna, czyli stopień i szybkość wchłaniania substancji leczniczej z leku odwrotnego (odpowiednika) wobec leku referencyjnego, który był przedmiotem pełnych badań klinicznych, świadczy o równoważności biologicznej obu preparatów. Preparatem referencyjnym jest zazwyczaj lek oryginalny, tzw. innowacyjny (*innovator product*).

Badanie równoważności biologicznej ma za zadanie potwierdzenie w warunkach *in vivo* właściwej jakości odpowiednika, na którą wpływ mogą mieć czynniki wynikające z odmiennej technologii wytwarzania. Istnieją preparaty, które z założenia są równoważne ze swoimi odpowiednikami farmaceutycznymi, np. roztwory wodne (o jednakowym składzie i stężeniu substancji czynnych i dodatków) do podawania parenteralnego, doustnego, preparaty do oka, ucha, aerozole do nosa, do nebulizacji. Niektóre produkty do podawania doustnego mogą

Types of bioequivalence investigation on the example of trimetazidine

There is a variety of methods to evaluate bioequivalence of generic medicinal product and of innovator product. In our study the bioavailability of trimetazidine from Cyto-Protectin MR (Ethifarm) was compared with the bioavailability of the drug from Preductal MR (Anpharm) following single dose after meal and in steady-state after chronic dosing. The investigations were carried out in 35 healthy male volunteers in cross-over, randomized design. Serum concentrations of trimetazidine were measured by means of HPLC. The results indicate that bioavailability of trimetazidine from Cyto-Protectin MR do not differ significantly from its bioavailability from Preductal MR. Both preparations can be considered as bioequivalent.

Keywords: innovator product, generic medicinal product, bioequivalence, bioavailability, trimetazidine.

© Farm Pol, 2009, 65(11): 761-764

uniknąć konieczności badania równoważności biologicznej, jeśli zawierają substancję aktywną o wysokiej rozpuszczalności i wysokiej przenikalności przez błony biologiczne, szybko uwalnianą z postaci farmaceutycznej. Badania równoważności biologicznej są natomiast konieczne w przypadku doustnych preparatów o szybkim uwalnianiu, postaci o modyfikowanym procesie uwalniania, transdermalnych systemów terapeutycznych, preparatów do podawania pozajelitowego, jak czopki, kremy, maści, które powinny mieć działanie ogólnoustrojowe.

Niezależnie od rodzaju preparatu, podstawowym badaniem wymaganym do oceny równoważności biologicznej jest badanie dostępności biologicznej po jednorazowym podaniu leku na czczo. W przypadku postaci o przedłużonym uwalnianiu substancji czynnej dostępność biologiczna powinna być oceniana zarówno po jednorazowym podaniu, jak i w stanie

stacjonarnym po podaniu wielokrotnym. Dla wszystkich doustnych preparatów o modyfikowanym uwalnianiu istnieje konieczność oceny wpływu pokarmu na dostępność biologiczną, dlatego badanie powinno być przeprowadzone również po jednorazowym podaniu leku bezpośrednio po posiłku [1].

Zasady określania równoważności biologicznej produktów leczniczych regulowane są w krajach UE przez dokumenty wynikające z Wytycznych Europejskiej Agencji Oceny Leków EMA, m.in.: Wytyczne do badań dostępności biologicznej i równoważności biologicznej [2], Międzynarodowej Konferencji ds. Harmonizacji Wymagań dla leków [3]. Pomocne są również wytyczne opracowane przez WHO [4] i FDA [5].

Badaniem z wyboru w ocenie równoważności biologicznej dwóch preparatów jest oznaczenie w surowicy (bądź w osoczu lub pełnej krwi) stężenia leku na grupie jednorodnych, zdrowych ochotników bądź na pacjentach z określonym schorzeniem. W badaniach tych obowiązują zasady Dobrej Praktyki Klinicznej (GCP) [6, 7]. Przestrzeganie tych zasad warunkuje odpowiedni dobór ochotników do badania, właściwe podawanie leków, pobieranie krwi, monitorowanie bezpieczeństwa probantów w czasie prowadzenia badań.

Celem pracy było porównanie biodostępności trimetazydyny z preparatów o zmodyfikowanym profilu uwalniania: Cyto-Protectin MR tabletki powlekane 35 mg produkcji Ethifarm (lek odtwórczy) i Preductal MR tabletki powlekane 35 mg produkcji Anpharm (lek referencyjny) u zdrowych ochotników.

Trimetazydyna ze względu na swoje działanie przeciwniedokrwienne i przeciwdusznicowe ma w farmakoterapii ugruntowaną pozycję. Stosowana

jest z dobrym efektem klinicznym w kardiologii i otolaryngologii, pozbawiona jest poważnych działań niepożądanych, jest bezpieczna dla pacjenta. Dobrze i szybko wchłania się z przewodu pokarmowego, słabo wiąże się z białkami, wydalana jest głównie przez nerki w postaci niezmienionej [8, 9]. Na rynku leków pojawiają się wciąż nowe postaci farmaceutyczne zawierające tę substancję.

Materiały i metody

Przed rozpoczęciem badań uzyskano pozytywne orzeczenie Komisji Etyki Badań (3/2006 z 19.06.2006). Badanie zostało zarejestrowane w Centralnej Ewidencji Badań Klinicznych (CEBK/0336 z 13.10.2006) i prowadzono je zgodnie z zasadami GCP.

Badaniem objęto grupę 35 zdrowych, płatnych ochotników, mężczyzn w wieku od 19 do 41 lat, spełniających kryteria włączenia do badania.

Kryteria włączenia to:

- płeć męska,
- wiek 18–55 lat,
- prawidłowa masa ciała (należna dla danej osoby o określonej płci, wzroście i wieku $\pm 20\%$),
- dobry stan zdrowia – u ochotników nie stwierdza się stanów chorobowych, a w dniu włączenia do badania nie powinni podlegać jakiegokolwiek farmakoterapii,
- prawidłowe wyniki badań internistycznych oraz podstawowych badań laboratoryjnych.

Uczestnicy badań podpisali Świadomą Zgodę na udział w badaniu, zostali poinformowani o szczegółach badania i warunkach ubezpieczenia. W trakcie badań przebywali w placówce NZOZ pod stałą opieką medyczną. Badanie przeprowadzono metodą otwartej, randomizowanej, krzyżowej próby.

Porównanie dostępności biologicznej, obejmujące ocenę parametrów farmakokinetycznych obu preparatów, przeprowadzono w dwóch częściach:

- 1) po jednorazowym podaniu po posiłku (cz. 1) – 18 probantów,
- 2) w stanie stacjonarnym (cz. 2) – 17 probantów.

W trakcie całego okresu badania oraz 24 godziny poprzedzające pierwsze pobranie krwi probanci zobowiązali się nie pić żadnych napojów zawierających alkohol lub kofeinę.

W pierwszej części badania ochotnicy przed podaniem leku spożyli w ciągu 15 minut standardowy posiłek bogaty w tłuszcze. Każdy z ochotników otrzymał dwukrotnie, w odstępie 14-dniowym, 2 tabletki (70 mg) leku (na przemian Preductal MR i Cyto-Protectin MR). Krew do oznaczania stężenia leku w surowicy (po 5 ml) pobierano przed podaniem leku (0) oraz po: 2, 3, 4, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 8, 9, 10, 11 i 24 godzinach.

W części badania obejmującej wielokrotne podanie leku, w celu uzyskania stanu stacjonarnego, każdy

Tabela 1. Średnie stężenia trimetazydyny w surowicy (ng/ml) po jednorazowym podaniu po posiłku preparatów Cyto-Protectin MR i Preductal MR

Czas pobrania krwi (godz.)	Cyto-Protectin MR	Preductal MR
	Wartości średnie stężenia trimetazydyny \pm SD	
0	0	0
2	5,38 \pm 0,31	5,30 \pm 0,06
3	17,19 \pm 2,16	18,89 \pm 3,41
4	28,33 \pm 3,80	27,92 \pm 4,12
5	42,72 \pm 1,15	42,93 \pm 3,25
5,5	53,69 \pm 3,77	54,43 \pm 3,91
6	62,73 \pm 8,36	67,43 \pm 9,01
6,5	82,17 \pm 9,12	85,49 \pm 8,74
7	70,74 \pm 5,42	70,77 \pm 5,69
8	64,65 \pm 3,30	63,39 \pm 5,07
9	59,89 \pm 5,24	58,70 \pm 5,10
10	51,52 \pm 3,15	52,74 \pm 4,41
11	42,30 \pm 2,43	42,71 \pm 4,13
24	13,56 \pm 2,94	11,87 \pm 3,38

z uczestników otrzymywał 70 mg leku (Preductal MR lub Cyto-Protectin MR na przemian, wg zasady cross-over, w odstępie 21-dniowym) raz na dobę przez 7 dni. Krew do badania pobierano na koniec okresu dawkowania (tj. tuż przed podaniem następnej dawki leku). Po uzyskaniu stanu stacjonarnego krew pobierano przez 24 godziny od ostatniego podania (w odstępach czasu, jak po podaniu jednorazowym).

Pobraną krew wirowano, uzyskaną surowicę zamrażano w temperaturze -20°C do chwili przeprowadzenia oznaczenia. Trimetazydynę z surowicy ekstrahowano wg metody opisanej przez Courte i Brome [10] i oznaczano jej stężenie metodą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej HPLC, opisaną przez Simmy i Amin [11].

W badaniu po jednorazowym podaniu leku po posiłku określano u poszczególnych probantów wartość stężenia maksymalnego (C_{\max}) i czas jego wystąpienia (T_{\max}), wielkość pola pod krzywą stężenia leku w czasie (AUC_{last} , AUC_{total}) oraz wartości $T_{0,5}$ (biologiczny okres półtrwania) i Lz (stała eliminacji).

W drugiej części badania (w stanie stacjonarnym) oznaczano stężenie maksymalne (C_{\max}) i czas jego wystąpienia (T_{\max}) oraz stężenie minimalne (C_{\min}) i średnie stężenie w stanie stacjonarnym (C_{avg}), jak również pole pod krzywą stężenia leku w czasie w przedziale dawkowania (AUC_{ss}) oraz % fluktuacji (% Flu).

W celu wyznaczenia zakresu liniowości, granicy detekcji i granicy oznaczenia analizowano serię próbek wzorcowych o znanych stężeniach trimetazydyny. Wyznaczono także precyzję, dokładność i powtarzalność metody oraz wydajność ekstrakcji.

Obliczenia statystyczne wykonano przy użyciu programów Statgraphics v. 5.0, Kinetica v. 4.4, Excel 2005. Wykonano statystykę opisową dla stężeń trimetazydyny oraz parametrów farmakokinetycznych i logarytmów naturalnych parametrów farmakokinetycznych po podaniu leku badanego, jak i leku referencyjnego. Dokonano dwuczynnikowej analizy wariancji dla kwadratu łańciskowego, w celu uwzględnienia wszystkich ewentualnych źródeł zmienności (międzyosobniczych, rodzaju podanego leku, kolejności podawania leków) po transformacji logarytmicznej (logarytm naturalny) zarówno po jednorazowym podaniu po posiłku, jak i w stanie stacjonarnym. Przedziały ufności konstruowano przy 90% ($1-2\alpha$) poziomie istotności. Przyjęto przedziały ufności dla równoważności biologicznej według wytycznych EMEA.

Wyniki i omówienie

Granica detekcji wynosiła 5 ng/ml, zakres liniowości 5–300 ng/ml. Odtwarzalność metody dla stężeń 20 i 200 ng/ml wynosiła odpowiednio $19,89 \pm 1,62$ ng/ml i $201,76 \pm 7,58$ ng/ml. Wydajność ekstrakcji wynosiła 95,025%. Średnie wartości stężeń trimetazydyny, dla obu badanych preparatów

Tabela 2. Parametry farmakokinetyczne trimetazydyny i ich logarytmy naturalne po jednorazowym podaniu po posiłku preparatów Cyto-Protectin MR i Preductal MR

	Cyto-Protectin MR	Preductal MR
	Wartości średnie \pm SD	
C_{\max} (ng/ml)	82,17 \pm 9,12	85,49 \pm 8,74
T_{\max} (h)	6,50 \pm 0	6,50 \pm 0
AUC_{last} (ng/ml) x h	798,35 \pm 27,32	794,79 \pm 39,76
AUC_{total} (ng/ml) x h	947,87 \pm 53,67	935,16 \pm 59,48
Lz (h^{-1})	0,09 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01
$T_{0,5}$ (h)	7,39 \pm 0,71	7,19 \pm 0,81
$\ln C_{\max}$	4,40 \pm 0,11	4,44 \pm 0,09
$\ln T_{\max}$	1,87 \pm 0	1,87 \pm 0
$\ln AUC_{\text{last}}$	6,68 \pm 0,03	6,67 \pm 0,05
$\ln AUC_{\text{total}}$	6,85 \pm 0,05	6,83 \pm 0,06
$\ln Lz$	-2,36 \pm 0,09	-2,33 \pm 0,11
$\ln T_{0,5}$	1,99 \pm 0,09	1,96 \pm 0,11

Tabela 3. Średnie stężenia trimetazydyny w surowicy (ng/ml) po wielokrotnym podaniu preparatów Cyto-Protectin MR i Preductal MR

Czas pobrania krwi (godz.)	Cyto-Protectin MR	Preductal MR
	Wartości średnie stężenia trimetazydyny \pm SD	
0	0	0
24	9,05 \pm 3,50	9,06 \pm 2,69
48	21,92 \pm 4,93	16,22 \pm 6,68
72	35,00 \pm 6,94	31,43 \pm 8,79
96	39,33 \pm 5,05	40,78 \pm 8,93
120	43,86 \pm 5,89	47,17 \pm 6,27
144	49,30 \pm 3,69	50,38 \pm 3,90
146	52,67 \pm 3,73	54,27 \pm 3,66
147	59,84 \pm 6,27	58,68 \pm 5,02
148	64,01 \pm 6,17	69,01 \pm 10,13
149	75,07 \pm 7,06	80,08 \pm 9,65
149,5	93,69 \pm 10,65	96,95 \pm 6,75
150	115,40 \pm 13,47	115,51 \pm 9,15
150,5	149,13 \pm 7,03	145,02 \pm 13,31
151	123,96 \pm 28,15	120,11 \pm 16,45
152	101,50 \pm 17,60	105,99 \pm 10,62
153	99,09 \pm 17,84	98,29 \pm 9,86
154	87,96 \pm 15,23	92,49 \pm 10,08
155	72,31 \pm 19,63	82,39 \pm 11,96
168	36,68 \pm 11,38	33,22 \pm 9,57

po jednorazowym podaniu leków po posiłku, zestawiono w tabeli 1. Średnie stężenie maksymalne po zastosowaniu preparatu Cyto-Protectin MR wyniosło $82,17 \pm 9,12$ ng/ml i zostało osiągnięte po upływie 6,5 godz., a w przypadku preparatu Preductal MR wyniosło $85,49 \pm 8,75$ ng/ml i wystąpiło również po 6,5 godz. Parametry dostępności biologicznej

Tabela 4. Parametry farmakokinetyczne trimetazydyny i ich logarytmy naturalne w stanie stacjonarnym po wielokrotnym podaniu preparatów Cyto-Protectin MR i Preductal MR

	Cyto-Protectin MR	Preductal MR
	Wartości średnie \pm SD	
AUC _{ss} (ng/ml) x h	1613,75 \pm 207,50	1677,92 \pm 115,87
C _{min} (ng/ml)	35,07 \pm 12,84	33,22 \pm 9,57
C _{max} (ng/ml)	151,18 \pm 8,03	145,64 \pm 13,46
T _{max} (h)	150,56 \pm 0,17	150,53 \pm 0,12
C _{avg} (ng/ml)	67,24 \pm 8,64	69,91 \pm 4,82
%Flu	176,83 \pm 40,88	161,60 \pm 30,37
ln AUC _{ss}	7,37 \pm 0,13	7,42 \pm 0,07
ln C _{min}	3,46 \pm 0,50	3,45 \pm 0,32
ln C _{max}	5,01 \pm 0,05	4,97 \pm 0,09
ln T _{max}	5,01 \pm 0,00	5,01 \pm 0,00
ln C _{avg}	4,20 \pm 0,13	4,24 \pm 0,07
ln%Flu	5,15 \pm 0,21	5,07 \pm 0,17

i farmakokinetyczne oraz ich logarytmy przedstawiono w **tabeli 2**. Wartość AUC_{last} trimetazydyny w surowicy dla preparatu Cyto-Protectin MR wyniosła 798,35 \pm 27,33 (ng/ml) \times h, a dla leku referencyjnego (Preductal MR) 794,79 \pm 39,76 (ng/ml) \times h. Wartość całkowitego pola pod krzywą zmian stężenia w czasie (AUC_{total}) dla leku badanego (Cyto-Protectin MR) wyniosła 947,87 \pm 53,67 (ng/ml) \times h, a dla leku referencyjnego 935,17 \pm 59,48 (ng/ml) \times h. Dla leku badanego T_{0,5} wynosiła 7,39 \pm 0,72 h, a stała eliminacji 0,09 \pm 0,01 1/h, dla leku referencyjnego odpowiednio 7,19 \pm 0,81 h oraz 0,09 \pm 0,01 1/h.

Przedziały ufności przy 90% współczynnika ufności mieszczą się w przyjętych granicach równoważności dla wartości zlogarytmowanych analizowanych parametrów. Analiza mocy testu wykazała wystarczającą moc (80%) przy badaniu na 18 ochotnikach. Pozwala to na stwierdzenie, że porównywane preparaty są równoważne biologicznie.

Tabela 3 zawiera średnie wartości stężeń trimetazydyny uzyskane w stanie stacjonarnym w części 2 badania, zaś parametry farmakokinetyczne wraz z ich logarytmami zostały przedstawione w **tabeli 4**. Średnie stężenie maksymalne (C_{max}) trimetazydyny po zastosowaniu preparatu Cyto-Protectin MR wyniosło 151,18 \pm 8,04 ng/ml i zostało osiągnięte po upływie 150,56 \pm 0,17 godz. od chwili pierwszego podania leku (początek badania), a w przypadku preparatu Preductal MR wyniosło 145,641 \pm 13,46 ng/ml i wystąpiło po 150,53 \pm 0,12 godz. od chwili pierwszego podania.

Średnie C_{min} po podaniu badanego preparatu to 35,07 \pm 12,843 ng/ml, a 33,22 \pm 9,57 po podaniu leku referencyjnego, zaś C_{avg} to odpowiednio 67,24 \pm 8,64 ng/ml i 69,91 \pm 4,82 ng/ml. Wartości pola pod krzywą AUC_{ss} po podaniu leku badanego to 1613,75 \pm 207,49 (ng/ml) \times h i 1677,92 \pm 115,87 (ng/ml) \times h po podaniu leku referencyjnego. Wartość procentu fluktuacji trimetazydyny w stanie stacjonarnym (%Flu) dla leku badanego wyniosła 176,83 \pm 40,88%, a dla leku referencyjnego 161,60 \pm 30,37%.

Przedziały ufności przy 90% współczynnika ufności mieszczą się w przyjętych granicach równoważności dla wartości logarytmowanych C_{max}, C_{min}, AUC_{ss}, T_{max}, %Flu oraz C_{avg}. Analiza mocy testu wykazała wystarczającą moc (80%) dla badania na 17 ochotnikach. Pozwala to na jednoznaczny wniosek o biorównoważności badanych leków w stanie stacjonarnym.

Wniosek

Preparat Cyto Protectin MR tabletki 35 mg produkcji Ethifarm nie różni się dostępnością biologiczną i innymi parametrami farmakokinetycznymi od preparatu referencyjnego Preductal MR firmy Anpharm. Preparaty te należy uznać za biorównoważne. Cyto-Protectin MR tabletki 35 mg spełnia wymogi stawiane preparatom odtwórczym.

Otrzymano: 2009.08.10 · Zaakceptowano: 2009.08.27

Piśmiennictwo

1. Marzec A. (red): *Badania dostępności równoważności biologicznej*. Wyd. 1. Warszawa: OIN OIN PHARMA, 2007. S. 384. ISBN 978-83-919134-6-8.
2. Note for Guidance on Investigation of Bioavailability and Bioequivalence. CPMP/EWP/QWP/1401/98, 26 July 2001.
3. International Conference of Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use (ICH).
4. WHO Expert Committee on Specification for Pharmaceutical Preparations Fortieth Report, Geneva 2006.
5. Code of Federal Regulations. Title 21 – Food and Drugs. Bioavailability and Bioequivalence Requirements. Revised April 1, 2003.
6. Note for Guidance on good clinical practice. EMEA 1996 (CPMP/ICH/135/95).
7. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z 11 marca 2005 r. w sprawie szczegółowych wymagań Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. z 2005 r. nr 57, poz. 500).
8. D'hahan M.: Trimetazidine: Potential mechanism of action in hypertrophic cardiomyopathy. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1999, 33 (3), 500–506.
9. McClellan K. J., Plosker G. L.: Trimetazidine: A review of its use in stable angina pectoris and other coronary conditions. *Drugs* 1999, 58 (1), 143–147.
10. Courte S., Brome T.N.: Trace determination of trimetazidine in plasma by high-performance liquid chromatography using fluorescence detection. *J. Chromatography* 1981, 224, 162–167.
11. Simmy O.T., Amin P.D.: Trimetazidine: stability indicating RPLC assay method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001, 25, 191–195.