

PRO GRADU -TUTKIELMA

KIRJALLISUUSKATSAUS: KESKEISIMMÄT EROAVAISUUDET
BIOEKVIVALENSSITUTKIMUSTEN VIRANOMAISOHJEISTOISSA

KOKEELLINEN OSA: CAT-SIMULAATIOMALLINNUS
BIOEKVIVALENSSITUTKIMUSTEN RISKIARVIOSSA

Susanna Heinonen
Helsingin yliopisto
Farmasian tiedekunta
Biofarmasian osasto

Toukokuu 2010

KESKEISIMMÄT EROAVAISUUDET BIOEKVIVALENSSITUTKIMUSTEN
VIRANOMAISSOHJEISTOISSA

Susanna Heinonen
Pro gradu -tutkielman
kirjallisuuskatsaus
Helsingin yliopisto
Farmasian tiedekunta
Biofarmasian osasto

Toukokuu 2010

Sisällysluettelo

<u>1 JOHDANTO</u>	1
<u>2 YLEISTÄ BIOEKVIVALENSSITUTKIMUKSISTA</u>	2
<u>2.1 Käsitteitä</u>	2
<u>2.2 Bioekvivalenssitutkimusten taustaa</u>	3
<u>2.3 Lääkevalmisteita valvovat viranomaistahot</u>	4
<u>2.4 Säädökset ja ohjeistot kliinisiin (bioekvivalenssi)tutkimuksiin</u>	5
<u>2.5 Bioekvivalenssitutkimukset lääkekehityksessä</u>	6
<u>2.6 Haasteet geneeristen lääkevalmisteiden myyntilupamenettelyssä</u>	8
<u>3 BIOEKVIVALENSSITUTKIMUKSEN SUORITUS JA VIRANOMAISOHJEISTOT</u>	10
<u>3.1 Tutkimusasetelma: moniannostutkimus</u>	10
<u>3.3 Tutkimuksen suoritus: ravintoon liittyvät olosuhteet</u>	13
<u>3.4 Mitä analyyttejä tutkitaan: alkuperäinen lääkeaine ja/tai metaboliitti</u>	16
<u>4 ERITYISHUOMIOITA VAATIVAT SEIKAT BIOEKVIVALENSSITUTKIMUKSISSA</u>	20
<u>4.1 Kapean terapeuttisen leveyden lääkeaineet</u>	20
<u>4.2 Lääkeaineet/valmisteet, joilla esiintyy runsaasti variaatiota</u>	22
<u>4.3 In vitro tutkimukset ja in vivo bioekvivalenssitutkimusten biowaiver</u>	25
<u>5 BIOEKVIVALENSSITUTKIMUSTEN HAASTEET TULEVAISUUDESSA</u>	28
<u>6 YHTEENVETO</u>	30
<u>7 KIRJALLISUUSLUETTELO</u>	32

1 JOHDANTO

Akateemisen maailman, farmaseuttisen teollisuuden ja terveysviranomaisten ponnistelujen aikaansaannoksena, on löydetty yhteisymmärrys keskeisistä kysymyksistä BE-tutkimuksiin liittyen, ja BE-hyväksymisrajat on huolellisesti osoitettu paikkansapitäviksi. Tämä näkyy siinä, että BE-tutkimusten suorittamiseen liittyvät menettelytavat ovat hyvin dokumentoituna useisiin viranomaisten tiedonantoihin, ohjeistoihin ja niihin liittyviin julkaisuihin. Kuitenkin siitä huolimatta, että on olemassa pääperiaatteita, jotka ohjaavat bioekvivalenssitutkimusten suunnittelua sekä toteutusta, ja vaikka ne ovat yleisesti hyväksytyjä, aluekohtaisissa viranomaissäädöksissä ympäri maailman on nähtävissä merkittävää vaihtelua. Aluekohtaisten erojen ymmärtäminen on välttämätöntä, sillä farmaseuttinen teollisuus globalisoituu kaiken aikaan.

Maantieteellisiä alueita, jotka ovat huomattavan aktiivisia geneeristen lääkevalmisteiden kehityksessä, ovat Yhdysvallat, Kanada, Euroopan Unioni, ja Intia. Useimmiten suomalaiset lääkeyritykset ovat tekemässä Yhdysvaltojen (FDA, the Food and Drug Administration), ja Euroopan Unionin (EMA, European Medicines Agency) lääkkeiden valvonta- ja arviointiviranomaisten kanssa. Näin ollen kirjallisuuskatsauksessa käsitellään etupäässä näiden maanosien bioekvivalenssi-ohjeistoissa (FDA 2001 ja 2003; EMEA 2010) esitettyjä menetelmiä ja periaatteita bioekvivalenssin määrittämiseen sekä niissä esiintyviä eroavaisuuksia. Olennaisimpien erojen kohdalla pohditaan tieteellisiä syitä niiden taustalla. Tarkastelussa keskitytään ensisijaisesti oraalisiin, välittömästi lääkeaineen vapauttaviin, kiinteisiin lääkevalmisteisiin. Myös Maailman terveysjärjestön (WHO, The World Health Organization) bioekvivalenssin liittyviä ohjeistoa (2006) sivutaan sopivissa yhteyksissä.

2 YLEISTÄ BIOEKVIVALENSSITUTKIMUKSISTA

2.1 Käsitteitä

Rinnakkaislääkevalmisteella eli geneerisellä valmisteella tarkoitetaan patenttisuojan päätyttyä markkinoille tullutta lääkevalmistetta, joka sisältää samaa vaikuttavaa lääkeainetta kuin alkuperäisvalmiste, ja jonka vahvuus, lääkeumuoto ja annostelutapa ovat samat kuin vastaavassa alkuperäisvalmisteessä (Holmalahti 2005). Apuaineissa ja valmistustekniikassa voi olla eroja alkuperäisvalmisteeseen verrattuna.

Alkuperäislääke (vertailuvalmiste) on lääkevalmiste, jolle on ennen markkinoille tuomista tehty täydet tehon ja turvallisuuden osoittavat tutkimukset, ja joka on sen jälkeen saanut viranomaisilta myyntiluvan näiden tutkimustulosten perusteella (Holmalahti 2005).

Bioekvivalenssi (BE) tarkoittaa, että esim. kahta lääkevalmistetta pidetään biologisesti samanarvoisina ja yleensä keskenään vaihtokelpoisina, jos niiden pitoisuus-aikaprofiilit vertailevassa imeytymistutkimuksessa ovat niin samanlaiset, ettei ole odotettavissa eroja lääkkeen tehossa, laadussa tai sen turvallisuudessa (mahdollisissa haittavaikutuksissa) (FIMEA; Holmalahti 2005).

Lääkeaineen biologinen hyötyosuus (BA) (bioavailability) on se lääkeannoksen suhteellinen osuus, joka pääsee muuttumattomana systeemiseen verenkiertoon (kuva 1). Sitä voidaan kuvata myös nopeudeksi ja määräksi, jossa aktiivinen ainesosa imeytyy lääkevalmisteesta elimistöön ja on saatavilla vaikutuspaikallaan.

$$\text{Biologinen hyötyosuus} = \text{Imeytyminen} - \text{Metabolia} - \text{Efflux} - \text{Hajoaminen}$$

Kuva 1: Biologinen hyötyosuus

Lääkeaineen biofarmaseuttinen luokittelussa (BCS) lääkeaineet jaetaan neljään luokkaan liukoisuus- ja imeytymisominaisuuksien perusteella. *In vivo* bioekvivalenssikokeet voidaan viranomaisten hyväksymänä korvata *in vitro* dissoluutiotutkimuksilla sellaisten lääkeaineiden tapauksessa, jotka tiettyjen rajojen puitteissa, sekä liukenevat, että imeytyvät hyvin. Kyseistä tilannetta kutsutaan yleisesti termillä **BCS-biowaiver**.

2.2 Bioekvivalenssitutkimusten taustaa

Tänä päivänä, viranomaissäädösten mukaisesti, alkuperäisvalmisteet saavat tietyn mittaisen patenttisuojan (FDA, Approved Drug Products with Therapeutic Equivalence Evaluations (Orange Book), 2010). Sen umpeuduttua valmiste on avoin geneeriselle kilpailulle ja rinnakkaislääkevalmistajat saavat alkaa markkinoida omia, vaikutuksiltaan vastaavia, mutta halvempia, tuotteitaan. Tätä menettelyä varten säädettiin USA:ssa neljännesvuosisata sitten (1984) niin kutsuttu Waxman-Hatch -laki, joka vaikutti huomattavasti geneeriseen lääketieteeseen. Tämä lainsäädäntö takaa alkuperäisvalmistajille riittävän yksinoikeussuojan, sekä helpottaa ja yksinkertaistaa geneeristen valmisteiden hyväksymistä lääkevirastoissa (Parker et al 1991) antamalla mahdollisuuden käyttää suppeampaa lupamenettelyä (an Abbreviated New Drug Application, ANDA), jolloin lääkeviranomaiset tarkastavat geneerisen lääkevalmisteen biofarmaseuttiset ominaisuudet etupäässä bioekvivalenssitutkimusten perusteella. Toisin sanoen prekliinisiä tai kliinisiä kokeita turvallisuuden ja tehon todistamiseksi ei enää tarvita, sillä nämä on jo kertaalleen todistettu aktiiviselle ainesosalle alkuperäisvalmistajien toimesta, jolloin valmistajien tulee ainoastaan osoittaa bioekvivalenssi alkuperäiseen lääkevalmisteseen nähden (Welage ym. 2001). Waxman-Hatch -laki sallii alkuperäisen lääkevalmisteen valmistajien patentille myös 5 vuoden jatkoajan, mikä kompensoi niiden myyntilupaprosessiin kulunutta aikaa ja resursseja.

Laki joudutti aikoinaan uusien lääkkeiden tutkimusta ja tuotekehitystä, sekä rohkaisi geneerisiä valmistajia tuottamaan ekvivalentteja lääkevalmisteita. Geneeristen myynnin kasvu jatkuu edelleen mm. siksi, että suuri määrä reseptilääkevalmisteista on

menettänyt/menettää patentin suojan lähiaikoina. Yhdysvalloissa, arviolta 110 lääkevalmisteelta raukesi/raukeaa patentti 2007 – 2010, mikä antaa mahdollisuuden geneerisille valmistajille tuoda markkinoille uusia, edullisempia geneerisiä lääkevalmisteita (Frank 2007). Lisäksi monissa maissa on pyritty laskemaan terveydenhuollon kustannuksia geneerisen substituution ja sitä täydentävän viitehintajärjestelmän avulla, mikä on entisestään lisännyt geneeristen lääkevalmisteiden käyttöä.

2.3 Lääkevalmisteita valvovat viranomaistahot

Euroopan lääkevirasto (EMA) on Euroopan unionin erillisvirasto. Sen tärkein vastuuala on ihmisten ja eläinten terveyden suojelu ja edistäminen arvioimalla ja valvomalla näiden käyttöön tarkoitettuja lääkkeitä. Virasto vastaa eurooppalaisten lääkevalmisteiden myyntilupahakemusten tieteellisestä arvioinnista. Kun käytetään keskitettyä menettelyä, yritykset toimittavat EMA:lle yhden ainoan myyntilupahakemuksen ja myyntilupa astuu voimaan kaikissa halutuissa Euroopan Unionin jäsenvaltioissa. Viraston valvoo lääkkeiden turvallisuutta jatkuvasti kansallisen lääkevalvontaverkoston avulla (Suomessa Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskus, FIMEA). EMA ryhtyy asianmukaisiin toimenpiteisiin, jos lääkevalmisteen riski/hyötysuhteessa on muutoksia lääkevalmisteen haittavaikutuksia koskevien raporttien mukaan. Virastolle kuuluu myös innovaatioiden ja farmakologisen tutkimuksen kannustaminen.

Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto eli FDA (*Food and Drug Administration*) on vastuussa säädöksen laatimisesta Yhdysvaltain markkinoille. FDA:n säädöksen piiriin kuuluvat ruoka, ravintolisät, lääkkeet, eläinlääkkeet, verta sisältävät tuotteet, lääkintälaitteet, säteilevät laitteet ja kosmetiikka. Lääkkeiden osalta FDA:n toimintaan kuuluu mm. tuotteiden hyväksyntä ja rekisteröinti, pakkausmerkinnät ja valmistusstandardit. FDA suorittaa tarkastuksia myös Yhdysvaltain ulkopuolella, jos kyseessä on lääketehdas, joka valmistaa Yhdysvaltain markkinoilla myytäviä lääkevalmisteita.

Maailman terveysjärjestö eli WHO (*World Health Organization*) on ihmisten terveyteen keskittyvä Yhdistyneiden kansakuntien elin. Maailman terveysjärjestön tehtävänä on taata kaikille ihmisille hyvä terveydentila. Se tuottaa julkaisuja, ja ohjeistoja mm. lääketeollisuudelle, koska sen tavoitteena on taata turvallinen lääketuotanto myös sellaisiin maihin (monet kehitysmaat), joissa ei ole lääkkeitä valvovia ja arvioivia viranomaistahoja.

2.4 Säädökset ja ohjeistot kliinisiin (bioekvivalenssi)tutkimuksiin

Kliinisiä lääketutkimuksia ovat kaikki ihmiseen kohdistuvat tutkimukset, joilla selvitetään lääkkeiden vaikutuksia ihmiseen, sekä lääkkeiden imeytymistä, jakautumista, metaboliaa tai erittymistä ihmiselimistössä (Läkelaki 86 §). Niiden tarkoituksena on mm. varmistaa lääkkeen teho ja turvallisuus tai bioekvivalenssi.

Kliinisten lääketutkimusten tulee noudattaa eettisiä periaatteita. Helsingin julistus (1964) on ihmisiin kohdistuvan lääketieteellisen tutkimuksen keskeinen eettinen ohjeisto (uusin versio vuodelta 2008). Tämän lisäksi myyntiluvan saamiseksi kliinisten tutkimusten tulee olla hyvän kliinisen tutkimustavan, eli GCP:n (Good Clinical Practice) ja kyseisen maan tai maanosan (josta myyntilupaa ollaan hakemassa) lakien, direktiivien ja viranomaismääräysten ja – ohjeiden mukaisia. Näin ollen kliinisiin tutkimuksiin liittyy runsaasti valvontaa ja säätelyä.

Lisäksi on olemassa viranomaisohjeistoja myyntilupadokumentaatiosta, jossa ”Guideline” tarkoittaa sitovia ohjeistoja, jotka esimerkiksi Euroopassa määrittelee Euroopan Komissio, DGIII (EudraLex). ”Note for Guidance/ Points to Consider” ovat sen sijaan vahvoja suosituksia, jotka antavat yleiset ohjeet erityyppisten kliinisten tutkimusten suunnitteluun, toteutukseen, kontrolliryhmään, tilastomatemattiseen analyysiin ja tutkimuksen keston, mutta myös tautikohtaisia ja erityisryhmiä koskevia ohjeistoja. Myös FDA:lla on olemassa ”vastaavat” ohjeistot kliinisiin tutkimuksiin liittyen. Ohjeistojen dokumentit on tarkoitettu antamaan suosituksia ja selityksiä, miten täyttää viranomaisten säätelemät velvoitteet. Ohjeistoja ei ole tarkoitettu sitoviksi säädöksiksi, joten vaihtoehtoiset tutkimusasetelmat otetaan harkintaan, jos niiden

käyttöönottoa tuetaan myyntilupahakemuksessa hyvin perustelluilla tieteellisillä argumenteilla.

Biologisen hyötyosuuden (BA, bioavailability) ja bioekvivalenssin (BE, bioequivalence) tutkimusten arviointi, tutkimussuunnitelman rakenne ja osoituskyky (performance) ovat kehittyneet viimeisen kahden vuosikymmenen aikana, kun niitä koskeva tieto ja tekniikka ovat kehittyneet. Tästä syystä myös aluekohtaiset BA/BE-ohjeistot ovat muokkautuneet ajan kuluessa (päivitykset). Käytännössä ohjeistoihin liittyy hyvin usein tiettyä tulkinnanvaraisuutta ja joissain tapauksissa vanhentuneita käytäntöjä, mitkä herättävät kysymyksiä ja kritiikkiä lääketeollisuudessa ja tutkijoiden keskuudessa. Jos tietyt aihepiirit toistuvat viranomaistahoille lähetetyissä tiedusteluissa, niitä pyritään avaamaan ja päivittämään myös suppeampien julkaisujen kautta (varsinaisten ohjeistojen päivityksien välillä). Myöhemmin niissä esitetyt ohjeet siirretään uuteen, päivitettyyn, ohjeistoon, josta tehdään aluksi luonnos, jota tietyn ajanjakson ajan mm. tieteenharjoittajat ja lääketeollisuus saavat kommentoida (pyytää täsmennyksiä, kritisoida).

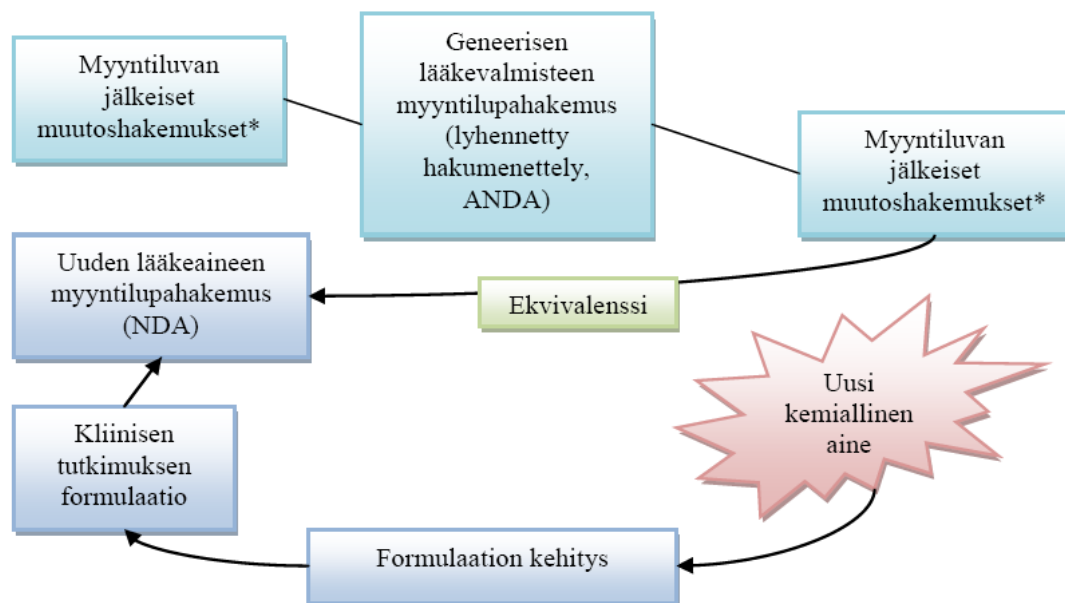
Bioekvivalenssi-ohjeistoista viimeisimpänä on uudistunut EMA:n ohjeisto (Guideline on the investigation of bioequivalence 10.2.2010). Tätä ennen EMA:lta ilmestyi varsinaiseen BA/BE-tutkimusohjeistoon (EMEA 2002) liittyvien epäselvyyksien tarkennukseen tarkoitettuja julkaisuja (mm. Questions & Answers on the Bioavailability and Bioequivalence Guideline 2006), jotka sittemmin siirrettiin suoraan tai pienten muutosten jälkeen uuteen ohjeistoon (EMEA 2010).

2.5 Bioekvivalenssitutkimukset lääkekehityksessä

Tutkimukset biologisesta hyötyosuudesta (BA, bioavailability) ja biologisesta samankaltaisuudesta (BE, bioequivalence) (BA/BE-tutkimukset) ovat oleellisia lääkevalmisteiden kliinisessä kehityksessä ja lääkeformulaation optimoinnissa (Blume ym. 2005). Niiden perustavoite on mitata ja verrata formulaation toimintakykyä (lääkeaineen vapautuminen lääkevalmisteesta ja aktiivisen aineosan eliminaatio) kahden tai useamman farmaseuttisesti ekvivalentin lääkevalmisteen kesken. Jos

lääkevalmisteiden formulaatioiden toimintakyky voidaan todistaa samankaltaiseksi etukäteen vahvistetuilla, statistisesti määritetyillä farmakokineettisillä parametreilla, tällöin myös kliiniset vaikutukset (normaalin kliinisen vaihtelun sisällä) oletetaan ekvivalenteiksi (myös saman lääkkeen eri valmiste-erät). Toisin sanoen BA/BE-tutkimusten tavoitteena on linkittää lääkekehityskaaren aikana kehitetyt formulaatiot ja niiden erät siten, että ne pysyvät ekvivalentteina suhteessa alkuperäiseen formulaatioon.

Nykyisessä farmaseuttisessa tuotekehityksessä tarvitaan toistuvia BA/BE-tutkimuksia pitkin kemiallisen yhdisteen elinkaarta (kuva 2). Aluksi uusi kemiallinen yhdiste tarvitsee kattavat tutkimukset saadakseen myyntiluvan ja näihin kuuluu oleellisesti myös BA/BE-tutkimuksia. Ennen patentin umpeutumista lääkkeen markkinoille tuonut yritys saattaa joutua tekemään muutoksia lääkkeen formulaatioon, valmistusprosessiin, tai siinä käytettäviin laitteisiin (Scale-Up and Post-Approval Changes, SUPAC). On myös mahdollista, että kyseiselle lääkeyhdisteelle löydetään uusi lääketieteellinen indikaatio. Lähes poikkeuksetta tällaiset muutokset vaativat osoituksen ja dokumentoinnin valmisteen ekvivalenssin jatkuvuudesta.



Kuva 2: Bioekvivalenssi tutkimukset lääkekehityksessä.

* Scale-Up and Post-Approval Changes (SUPAC)

Saadakseen myyntiluvan geneerinen lääkevalmiste on osoitettava bioekvivalentiksi referenssivalmisteen kanssa. Lisäksi myös geneeristen lääkevalmisteiden elinkaaren kuuluu myyntiluvan jälkeinen ajanjakso (the post-approval period), jolloin valmistajat saattavat tehdä samantyyppisiä muutoksia, kuin alkuperäislääkkeen kohdalla aiemmin kuvatussa.

Aikaisemmin bioekvivalenssin todistamiseksi vaadittiin erilliset *in vivo* BA/BE-tutkimukset. Nykyään sekä alkuperäislääkevalmisteen, että geneerisen lääkevalmisteen kohdalla, voidaan tietyissä tilanteissa *in vitro* kokeisiin perustuen jättää kliiniset humaanitutkimukset tekemättä (BCS biowaiver).

Lääkeviranomaisten merkittävä haaste ja vastuu on varmistaa lääkevalmisteen bioekvivalenssi alkuperäisen lääkevalmisteen elinkaaren aikana tapahtuneiden muutosten jälkeen, sekä vastaavasti myös patentin umpeutumisen jälkeisten geneeristen valmisteiden elinkaaren aikana. Tätä taakkaa voitaisiin helpottaa vähentämällä ei-välttämättömiä bioekvivalenssitutkimuksia (biofarmaseuttinen luokitusjärjestelmä, BCS). FDA päivitti ja lievensi aikoinaan ensimmäisenä myyntiluvan jälkeiseen ajanjaksoon liittyvien *in vivo* BE-tutkimusten vaatimuksia ja v. 1995 FDA julkaisi tähän liittyen ohjeiston välittömästi lääkeaineen vapauttaville (IR) valmisteille (SUPAC-IR, *Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Scale-Up and Post-Approval Changes*). Siinä määritetään dissoluutio- tai bioekvivalenssivaatimukset lääkevalmisteeseen tehdyille muutoksille niiden tasoluokituksesta riippuen. Ohjeistossa hyödynnetään BCS-järjestelmää päätöksenteossa. Vastaava ohjeisto ilmestyi v. 1997 myös säädellysti lääkeainetta vapauttaville lääkevalmisteille (SUPAC-MR) (FDA 1997a). Nykyisin myös muille valmistetyypeille on olemassa vastaavia ohjeistoja (FDA 320 and § 314.70 (21 CFR 314.70)). EMEA julkaisi variaatioita koskevan ohjeistonsa vuonna 2005 (Guideline on stability testing for applications for variations to a marketing authorization).

2.6 Haasteet geneeristen lääkevalmisteiden myyntilupamenettelyssä

Tänä päivänä geneeristen lääkkeiden myyntilupamenettelyssä esiintyy ongelmia, koska sitä ei ole harmonisoitu. Pahimmassa tapauksessa on tehtävä kolme tai neljä

bioekvivalenssitutkimusta yhdelle formulaatiolle, kun halutaan myyntilupa useisiin maanosiin; Yhdysvallat, Eurooppa, Australia, Japani, Brasilia, jne. Tämä johtuu mm. siitä, että referenssivalmiste määritellään eri maissa/ maanosissa eri tavalla.

Eurooppalainen referenssivalmiste tarkoittaa sellaista valmistetta, joka on hyväksytty ja markkinoitu missä tahansa EU:n jäsenvaltiossa, joko keskitetyn käsittelymenettelyn kautta, tai hajautetusti. USA:ssa puolestaan referenssivalmiste on sellainen, jolla on myyntilupa USA:ssa, ja joka löytyy FDA:n laatimasta dokumentista, jossa listataan lääkevalmisteet, joille on tehty arvio terapeuttisesta samankaltaisuudesta, (FDA, Orange Book 2010). Lisäksi referenssi valmisteella tulee olla RLD-status (a reference-listed drug). Ei siis voi valita alkuperäisvalmistetta USA:sta ja jättää hakemusta Euroopassa viitaten USA:n RLD-valmisteeseen, vaikka alkuperäisvalmistaja olisikin sama ja samalla tuotenimellä EU:ssa sekä USA:ssa. Tämä johtuu siitä, että joissain tapauksissa alkuperäisvalmisteet (USA ja EU) voivat erota toisistaan koostumukseltaan ja vapautumisprofiililtaan, koska maanosien BE-ohjeistot vaatimuksineen eroavat tietyiltä osin toisistaan. Näin ollen, monet lääkeyritykset ovat ottaneet strategiakseen käyttää tuottamastaan rinnakkaisvalmisteesta samaa erää ja tehdä kaksi bioekvivalenssitutkimusta kahdella eri referenssivalmisteella (USA ja EU) ja lähettää lupahakemukset erillisille viranomaisille.

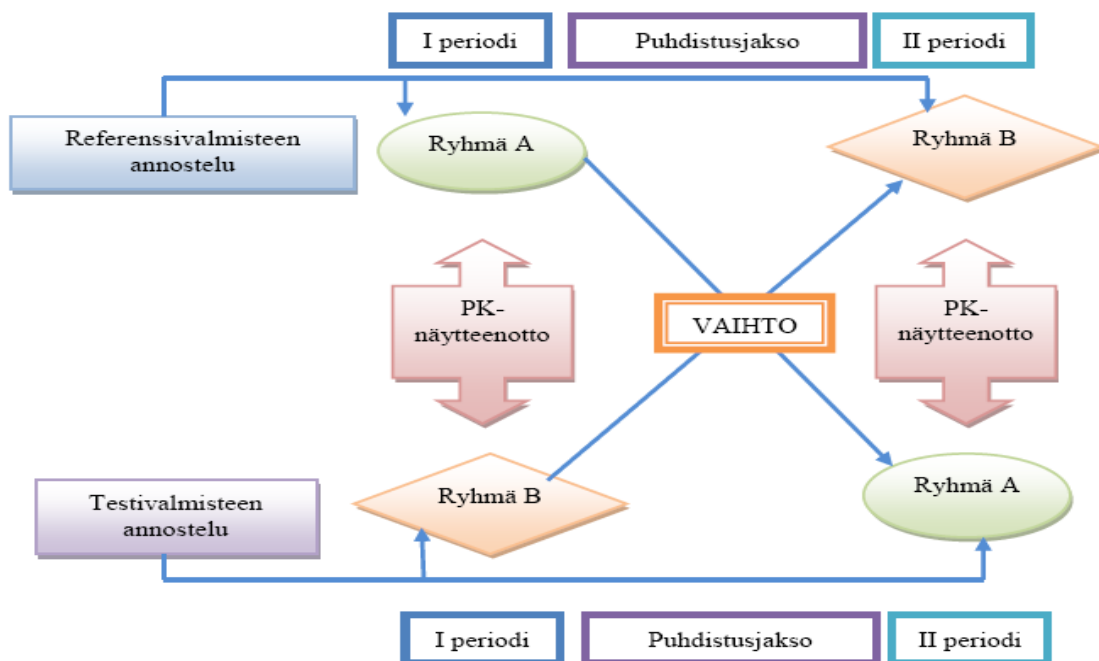
Käytännön syy edellä kuvattuun on ensinnäkin se, että jos jättää geneerisen myyntilupahakemuksen viitaten alkuperäislääkkeeseen, jonka myyntilupaa ei ole käsitelty ja hyväksytty ko. viranomaiskomissiossa, tällöin kyseisellä viranomaistaholla ei ole materiaalia, johon viitata arvioidessaan samankaltaisuutta lääkevalmisteiden välillä. Toiseksi, jos viranomainen ei ole erikseen määritellyt, mihin alkuperäislääkkeeseen viitataan ja kaksi geneerisen myyntiluvan hakijaa jättää hakemuksensa samoille markkinoille, saattaa tulla tilanne, jossa toinen viittaa alkuperäisvalmisteeseen USA:ssa ja toinen alkuperäisvalmisteeseen EU:ssa. Tällöin ko. markkinoiden viranomainen saattaa olla hyväksynyt myyntiin geneeriset lääkevalmisteet, jotka eivät välttämättä ole terapeuttisesti ekvivalentteja saman alkuperäisvalmisteen kanssa, mistä saattaa aiheutua turvallisuuteen ja tehoon liittyviä

riskejä sellaisille potilaille, jotka vaihtavat tuotenimeä (brändiä) kantavan alkuperäisen tuotteen generiseen rinnakkaisvalmisteeseen.

3 BIOEKVIVALENSSITUTKIMUKSEN SUORITUS JA VIRANOMAISOHJEISTOT

3.1 Tutkimusasetelma: moniannostutkimus

Lähes kaikkien, aktiivisesti geneerisiä valmisteita tuottavien, maantieteellisten alueiden (USA, EU, Kanada ja Intia) bioekvivalenssiyhjeistoissa suositellaan kiinteiden, oraalisten, IR-formulaatioiden ensisijaiseksi tutkimusasetelmaksi vertailevaa vaihtovuoroista, kahden periodin, peräkkäistä kerta-annostutkimusta (kuva 3) (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).



Kuva 3: Perinteinen ja yleisimmin bioekvivalenssitutkimuksissa käytetty kahden periodin vaihtovuoroinen tutkimusasetelma.

Muita tutkimusasetelmia ovat mm. rinnakkaistutkimusasetelma (parallel design) lääkeaineille, joilla on pitkä puoliintumisaika, ja toistotutkimus lääkeaineille, joilla esiintyy runsaasti variaatiota (FDA 2003; EMEA 2010). Poikkeaminen perinteisestä

tutkimusasetelmasta bioekvivalenssin osoittamiseksi voidaan oikeuttaa tieteellisin perusteluin, jolloin tulisi huomioida ja arvioida lääkeaineen fysikaaliskemialliset ja farmakokineettiset ominaisuudet, sekä lääkevalmisteen koostumuksen suhteellisuus (EMEA 2010). Perustelut ja oikeuskriteerit muille tutkimusasetelmille poikkeavat eri maiden ohjeistoissa.

Esimerkiksi moniannostutkimusasetelma on sallittu potilailla, jos lääkeaineen turvallisuuden takia ei voida järjestää kerta-annostutkimusta terveillä vapaaehtoisilla (kääntäen, kerta-annostutkimus ei sovellu potilaille) (EMEA 2010; WHO 2006). Moniannostutkimusta voidaan käyttää myös, jos analyttisessä herkkyudessa on ongelmia kerta-annoksen jälkeen (nykyään harvinaista), jolloin tarvitaan vakaantilan pitoisuusmääriä (FDA 2003; EMEA 2010; WHO 2006). Koska moniannostutkimusasetelma ei ole yhtä herkkä arvioimaan lääkeaineen *in vivo* vapautumista lääkevalmisteesta ja C_{max} -arvossa esiintyville eroille (el-Tahtawy ym. 1995; 1996; 1998), EMA painottaa, että myyntiluvan hakijan tulee täsmällisesti perustella ko. tutkimusasetelman käyttö BE-tutkimuksissa, sekä todistaa, ettei analyysimenetelmää voitu parantaa, ja että suuremman kuin terapeuttisen annoksen (supra-therapeutic dose) käyttömahdollisuus huomioitiin, mutta se ei antanut haluttua vaikutusta tai se ei ollut mahdollinen esim. turvallisuus syistä (EMEA 2010).

FDA:n mukaan (Guidelines on design of multiple-dose *in vivo* BA studies § 320.27(a)(3)) moniannostutkimus on tarpeellinen menetelmä bioekvivalenssi todistamiseksi, kun valmisteiden välillä on havaittavissa eroa imeytymisnopeudessa, muttei imeytyneessä määrässä, ja kun lääkeaineen biologisessa hyötyosuudessa esiintyy subjektien välistä variaatiota. Säädellysti lääkeainetta vapauttaville lääkevalmisteille (CR, controlled release) FDA ja WHO vaativat sekä kerta-annos-, että moniannostutkimusta (FDA 2003, WHO 2006). EMEA viittaa CR-valmisteisiin liittyen erilliseen ohjeistoon (Modified Release Oral and Transdermal Dosage Forms: Sections I and II, 2000).

Syy siihen, miksi moniannostutkimusta on vaadittu, jos lääkeaineella esiintyy epälineaarista kinetiikkaa (annoksesta tai ajasta riippuvaista, esim. saturoituva

metabolia, aktiivinen erittyminen) (FDA 2003; EMEA 2002; WHO 2006), on se, että näin varmistuttaisiin siitä, ettei kliinisessä tilanteessa lääkeaineen pitoisuus akkumuloituisi arvaamatta kerta-annos tutkimuksen perusteella odotettua korkeammalle (yli terapeutin leveyden) (Besag 2000). Lisäksi kirjallisuudessa on mainittu, että jotkut lääkevalmisteen sisältämät apuaineet voivat vaikuttaa lääkeaineen farmakokinetiikkaan vakaassa tilassa (Meredith 2003; Besag 2000), jolloin kerta-annostutkimuksella ei kyettäisi havaitsemaan tähän mahdollisesti liittyviä eroja formulaatioiden välillä. Annoksesta ja ajasta riippuvaisen farmakokinetiikan on siis ajateltu vaikuttavan haitallisesti lääkeformulaation suorituskykyyn ja lääkeaineen jakautumisominaisuuksiin, minkä takia epälineaarilla farmakokinetiikalla vaikuttaa bioekvivalenssitutkimuksen tutkimusasetelman valintaan (kerta-annos vs. moniannos) (Nation 1994).

Tunnetaan kuitenkin vain kaksi harvinaista tilannetta, milloin epälineaarisen kinetiikan kohdalla useamman lääkeannoksen antaminen todellakin korostaisi paremmin formulaatioissa esiintyviä eroavaisuuksia kuin kerta-annostutkimus: (1) Lääkeaineen puhdistuma ei pienene suhteellisesti (yli suhteellisen välin, supraproportional) moniannostelun jälkeisillä akkumulaation konsentraatioilla (esimerkiksi, kun kyseessä on saturoituva Michaelis-Menten kinetiikka, ja puoliintumisajat ovat huomattavasti pidemmät kuin annosteluväli, ja konsentraatiot ylittävät maksimaalisen reaktio nopeuden V_{max}). Tästä ilmiöstä on olemassa teoreettisia esimerkkejä (fenytoiini, Ludden ym. 1991), mutta ei virallisia tutkimusjulkaisuja. (2) Ajasta riippuvainen tekijä vaikuttaa oleellisesti formulaatioeroihin, eli jos esim. enteropäällyste vaikuttaa oleellisesti lääkeaineen pääsyyn systeemiseen verenkiertoon, mikä näkyy pitoisuus-aikakuvaajassa viiveenä imeytymisen alkamisessa (Elkoshi ym. 2002). Näin ollen, koska tarve moniannostutkimukselle epälineaarisen kinetiikan tapauksessa on erittäin harvinainen (enimmäkseen teoreettinen), voidaan yleisesti todeta, että kerta-annostutkimukset eivät ole pelkästään riittäviä, vaan myös herkimpiä havaitsemaan erot formulaatioiden välillä. Tämä antaa oikeutuksen sille, että EMA:n uusimassa ohjeistossa (2010) lääkeaineen epälineaarisen kinetiikan takia vaadittavista moniannostutkimuksista on luovuttu.

3.3 Tutkimuksen suoritus: ravintoon liittyvät olosuhteet

Ruoka vaikuttaa ruuansulatuskanavassa tiettyjen lääkevalmisteiden ja lääkeaineiden farmakokinetiikkaan. Vaikutukset bioekvivalenssiin ovat suurimmillaan juuri ravinnon nauttimisen jälkeen. Ruuan ravintoaineiden ja kalorien koostumus, tilavuus, ja lämpötila voivat aiheuttaa fysiologisia muutoksia GI-kanavaan, ja lääkeaineen systeemiseen imeytymiseen. Se, kuinka kliinisesti merkittäviä ruuan vaikutukset ovat biologiseen hyötyosuuteen, riippuu lääkeaineen terapeuttisesta käyttötarkoituksesta ja vaikutuksen suuruudesta. Lääkeaineen terapeuttinen leveys, tehokkuus (potentti), farmakokineettiset ja farmakodynaamiset ominaisuudet (annos-vaikutus -suhde) ja mahdolliset vakavat myrkyllisyys-/haittavaikutukset määrittelevät tarpeen kirjata pakkausselosteeseen (SPC-tekstiin, the summary of product characteristics) välttämättömät turvatoimenpiteet ja käyttöohjeet, jos niihin liittyy kliinisesti merkittäviä vaikutuksia. Vertailevassa bioekvivalenssitutkimuksessa tulee osoittaa, että mikä tahansa referenssivalmisteeseen, kliinisesti merkittävä, ruokaan liittyvä vaikutus on sama kuin testivalmisteella.

Näiden syiden takia tilanteet, jolloin on tarpeen tarkastella myös ravinnon vaikutusta bioekvivalenssiin, tulee harkita tarkkaan ja kirjata BE-ohjeistoihin. Lisäksi tarpeen vaatiessa on myös määriteltävä, tehdäänkö ruokatutkimukset paastotutkimusten lisäksi, vai sijasta (esim. haittavaikutukset). Viime vuosina viranomaistahot ympäri maailmaa ovat julkaisseet ohjeistoja, jotka enemmän tai vähemmän perusteellisesti ottavat kantaa edellä mainittuihin kysymyksiin. Yleisesti ottaen ruuan ja juoman standardointi on määritetty ohjeistoissa melko samalla tavoin: ”jokaiselle tutkittavalle kaikkien aterioiden ja nautittavien nesteiden koostumukset ja ajoitukset tulee yhtenäistää näytteenoton aikana”. Kuitenkin tarkemmat kriteerit vaihtelevat selkeästi alueittain, samoin kuin tutkimusten toteutus (mm. aterian laatu).

Lähes kaikkien alueiden ohjeistoissa kiinteiden, oraalisten formulaatioiden bioekvivalenssitutkimukset suositellaan yleisesti ottaen tehtäväksi paaston jälkeen, koska silloin olosuhteet ovat herkimmät havaitsemaan potentiaalisia eroja valmisteiden välillä. Lisäksi kaikissa tutkituissa ohjeistoissa (FDA 2003, EMEA 2010, WHO 2006) mainitaan kuitenkin, että säädellysti lääkeainetta vapauttavien valmisteiden

bioekvivalenssitutkimukset tulee suorittaa sekä paaston jälkeen, että aterian yhteydessä. Tämä johtuu siitä, että joissain tilanteissa ruoka heikentää formulaation kykyä vapauttaa lääkeaine säädellyllä tavalla, jolloin vaarana ovat vakavat haittavaikutukset koko annoksen yhtäkkisen vapautumisen ja lääkeaineen plasmapitoisuuden rajoittamattomasta kasvusta johtuen. Esimerkiksi, jos ko. lääkevalmiste jää paikalleen vatsaan, ja kun se vihdoin tyhjentyy ohutsuoleen, lääkeaine vapautuu kerralla ja välittömästi (Wonnemann ym. 2006).

FDA julkaisi v. 2002 perusteellisen ohjeiston (milloin ja miten) BE-tutkimuksista ruuan kanssa, ja sen yhteydessä tiedonannon, jossa määriteltiin, minkälaisille lääkeaineille edellytetään ruokatutkimukset. FDA:n suosittelee, että kaikille oraalisesti annetuille IR-lääkevalmisteille tulisi suorittaa BE-tutkimukset sekä paastossa, että ruuan kanssa, seuraavin poikkeuksin: Kun molemmat lääkevalmisteet (testi ja RLD-listattu referenssivalmiste) ovat nopeasti liukenevia, niillä on samankaltainen dissoluutio-profiili, ja ne sisältävät BCS-luokan I lääkeainetta (hyvä liukoisuus ja permeabiliteetti) (FDA 2001; Amidon ym. 1995), tai kun RDL-valmisteen pakkausselosteessa mainitaan, että se tulisi ottaa ainoastaan tyhjään vatsaan, tai pakkausselosteessa ei ole mitään mainintaa ruuan vaikutuksista lääkeaineen imeytymiseen tai valmisteen annosteluun. Ohjeiston mukaan ruuan vaikutuksia bioekvivalenssiin tulisi tutkia olosuhteissa, joilla on havaittu olevan suurin vaikutus maha-suolikanavaan ja oraaliseen lääkeaineen imeytymiseen ja systeemiseen vaikutukseen. Tällaiseksi määritellään (FDA 2002) runsasrasvainen (50 % aterian kokonaiskalorimäärästä tulee rasvasta) ja -kalorinen ateria (800–1000 kaloria), jossa 150 kaloria tulee proteiineista ja 250 hiilihydraateista ja loput siis rasvasta. Jos tästä ateriakoostumuksesta poiketaan, tulee siitä antaa tieteelliset perustelut.

FDA:n (2002) linjauksille löytyy tieteellisiä perusteluita. Ensinnäkin, ruuan vaikutukset biologiseen hyötyosuuteen on havaittu voitavan ennustaa BCS-luokituksen perusteella (Wu ja Benet 2005; Fleishet ym. 1999). Tämä perustuu siihen, että lääke-transportteri interaktioiden on havaittu useimmiten olevan ensisijainen mekanismi ruuan vaikutuksille biologisessa hyötyosuudessa (Amidon ym. 1995). Näin ollen ruuan vaikutukset (esim. pH muutokset, lääkeaineen, solubilisaatio) syntyvät sen aiheuttamista

muutoksista lääkeaineen liukoisuudessa tai muissa tekijöissä (Amidon ym. 1995; Charman ym., 1997). On väitetty, että runsasrasvaiset ateriat saattaisivat inhiboida, sekä influx- (BCS III lääkeaineiden imeytyminen laskee), että efflux-transporttereita (BCS II lääkeaineiden imeytyminen kasvaa) (Wu ja Benet 2005; Fleishet ym. 1999). Näin ollen, runsasrasvainen ravinto inhiboisi myös tärkeää P-glykoproteiinia, jonka substraatteja monet lääkeaineet ovat. Tästä syystä aterioiden, jotka sisältävät runsaasti kaloreita ja rasvaa, on havaittu vaikuttavat yleisimmin ja voimakkaimmin maha-suolikanavan fysiologiaan, ja näin niillä on suurempi vaikutus lääkeaineen tai lääkevalmisteen biologiseen hyötyosuuteen, mikä tulisi huomioida BE-tutkimusten toteutuksessa. Poikkeuksena BCS luokan I lääkeaineet, joiden biologisen hyötyosuuden tasoon runsasrasvaisen aterian ei oleteta vaikuttavan merkittävästi (FDA ei vaadi ruokatutkimuksia näille lääkeaineille). Tämä johtuu siitä, että niiden imeytymisen voidaan olettaa olevan täydellistä (hyvä liukoisuus ja permeabiliteetti), koska oletetaan, ettei niillä esiinny transportteri-interaktioita (Wu ja Benet 2005; Fleishet ym. 1999). On kuitenkin korostettu, että myös BCS I lääkeaineiden kohdalla runsasrasvaiset ateriat voivat viivästyttää mahan tyhjenemistä ja näin aiheuttaa T_{max} -ajankohdan viivästymistä (Wu ja Benet 2005; Fleishet ym. 1999).

EMA:n kohdalla sen aikaisemmassa ohjeistossa (2002) BE-tutkimuksia, joihin liittyi ruuan vaikutuksen tutkiminen, sivuttiin vain lyhyesti. Tämä suppeahko ohjeistus aiheutti kuitenkin tulkinnanvaraisuutta ja kysymyksiä lääketeollisuudessa ja lopulta EMA julkaisi aiheesta tarkennuksen (Question and Answers 2006). Julkaisun pääpiirteet päivitettiin myöhemmin EMA:n uusimpaan BE-ohjeistoon (2010), jossa edelleen suositellaan ensisijaisesti paastotutkimuksia. Tämä pätee myös tilanteisiin, joissa referenssivalmisteen SPC-tekstissä mainitaan, että se tulisi ottaa ainoastaan tyhjään vatsaan, tai ravinnosta riippumatta. Jos referenssivalmisteen SPC-tekstissä kuitenkin suositellaan lääkevalmisteen ottoa ainoastaan ruuan kanssa, BE-tutkimus tulee tehdä vain ravitussa tilassa (FDA:n ohjeisto 2002 vaatii molempia, paasto vs. ravittu). EMA (2010) vaatii, että myös ruuan koostumuksen tulisi ensisijaisesti olla referenssivalmisteen SPC-tekstin mukaista. Jos siinä ei kuitenkaan ole erityisiä vaatimuksia, ruuan koostumus on samanlainen kuin FDA:n ohjeistossa (2002).

FDA:n ohjeistosta (2002) poiketen, EMAn ohjeistossa (EMA 2010) mainitaan myös, että spesifejä formulaatio-ominaisuuksia (esim. mikroemulsiot, kiinteät dispersiot) omaavien lääkevalmisteiden BE-tutkimukset tulee suorittaa, sekä paastossa, että ruuan kanssa, ellei annostelulle ole erikseen annettu tarkkoja ehtoja (vain paasto/ravitut olosuhteet). Tämä perustuu siihen, että on havaittu, että jos lääkevalmisteen formulaatio vaikuttaa merkittävästi BCS luokan II lääkeaineiden liukoisuuteen, se voi vähentää tai poistaa runsasrasvaisten aterioiden vaikutuksen tämän luokan lääkeaineisiin (Wu ja Benet 2005; Fleishet ym. 1999). Tämän on ehdotettu olevan syy esimerkiksi siihen, miksi mikroemulsiomuodossa olevaan siklosporiinin formulaatioon (Neoral) ei vaikuta ruoka, kuten aikaisempaan oliiviöljypohjaiseen formulaatioon (Sandimmune). Näin ollen, jos testi- ja referenssivalmisteiden formulaatioissa on selkeitä eroja, tällä seikalla saattaisi olla vaikutusta BE-tutkimuksen erottelukykyyneen, ellei sitä suoriteta molemmissa olosuhteissa (ravittu/paasto).

WHO:n BE-ohjeisto (2006) on ylimalkaisempi. Se suosittelee yleisesti ottaen paastotutkimuksia. Jos lääkevalmisteen tunnetaan aiheuttavan GI-kanavaan häiriötä annettaessa paastossa, tai jos referenssivalmisteen SPC-teksti kieltää lääkevalmisteen annostelun ruuan kanssa, silloin farmakokineettiset BE-tutkimukset tulisi suorittaa ruuan kanssa. Ruuan koostumus riippuu paikallisesta ruokavaliosta ja tavoista.

3.4 Mitä analyyttejä tutkitaan: alkuperäinen lääkeaine ja/tai metaboliitti

Kaiken kaikkiaan metaboliitit ovat tärkeässä osassa lääkekehityksessä. On kuitenkin pitkään käyty keskustelua siitä, mikä on niiden rooli bioekvivalenssitutkimuksissa, eli pitäisikö metaboliitit määrittää myös niissä (Chen ja Jackson 1991). Tiedeyhteisöissä asiasta ollaan oltu erimielisiä (the Bio-International (I) scientific meeting 1989). Suurin syy metaboliitteihin liittyvään laajamittaiseen keskusteluun on se, että osa tutkijoista uskoo metaboliittien aktiivisuuden olevan kriittinen tekijä, joten ne tulisi huomioida myös bioekvivalenssia määrittäessä (Jackson ym. 2004). Aktiivisuudella tarkoitetaan metaboliitin osuutta kliiniseen farmakologiaan ja toisaalta toksisuuteen. On kuitenkin korostettava eroa bioekvivalenssin ja kliinisen farmakologian välillä, eli bioekvivalenssin suhteen ratkaiseva mitta on imeytyneen parentin ainesosan määrä systeemisessä verenkierrössä, eikä mitattavan ainesosan (esim. parentti ja/tai

metaboliitti) aktiivisuus (Jackson ym. 2004). Muita perusteluja metaboliittien käytölle bioekvivalenssin määrittämisessä aktiivisuusargumentin lisäksi on se, että metaboliitin pitoisuudet ovat yleisesti yhdistetty alhaisempaan subjektin sisäiseen vaihteluun ja näin ollen se mahdollistaa alhaisemman vaaditun subjektien määrän bioekvivalenssin aikaansaamiseen. Toisaalta, molempien analyttien (parentti ja metaboliitti) analysoiminen bioekvivalenssin määrittämiseksi on ongelmallista, koska se saattaa vähentää tyyppin I virhettä (kuluttajariski) ja kasvattaa tyyppin II virhettä (valmistajariski) (Midha ym. 1993; 2004). Osa tutkijoista on kaikesta huolimatta ollut sitä mieltä, että metaboliitteja ei tulisi käyttää bioekvivalenssin osoittamisessa, koska tutkimusten mukaan ne eivät ole herkkiä formulaatioeroille ja edelleen lääkeaineen imeytymisessä esiintyville muutoksille (Chen ja Jackson 1991).

Nykyisin tutkijoiden keskuudessa on olemassa yhteisymmärrys siitä, että BE-tutkimusten tulisi pohjautua yksinomaan lääkeaineen tutkimusdataan, jos seuraavat kriteerit täyttyvät (Jackson ym. 2004; Walter-Sack ym. 1993): (1) Aktiivisen metaboliitin (metaboliittien) pitoisuusprofiili on kaikissa aikapisteissä noin alle 10 % lääkeaineen vastaavaan arvoon verrattuna; (2) Lääkeaineen ja sen aktiivisen metaboliitin farmakologiset ja toksiset vaikutukset ovat olennaisesti samanlaiset; (3) On selvästi osoitettu, että kaikki farmakokineettiset prosessit, jotka määrittelevät lääkeaineen tai sen aktiivisen metaboliitin plasmakonsentraatiot, ovat lineaarisia kaikissa sellaisissa plasman pitoisuustasoissa, jotka ovat mahdollisia lääkkeen kliinisessä käytössä, ja (4) Lääkevalmisteen formulaatiotyyppi ei ole hitaasti lääkeainetta vapauttava (Jackson ym. 2004; Walter-Sack ym. 1993). Sen sijaan, seuraavissa tilanteissa on suositeltua mitata metaboliitti: (1) annosteltaessa inaktiivinen prodrug-lääkevalmiste; (2) varsinaisen lääkeaineen konsentraatio veressä on liian alhainen määritettäväksi; (3) varsinainen lääkeaine on epästabiili; (4) varsinaisen lääkeaineen puoliintumisaika on hyvin lyhyt.

Edellä mainitut kriteerit parentin ainesosan ja metaboliitin määrittämisestä on suurilta osin otettu käyttöön WHO:n BE-ohjeistossa. Lisäksi kaikki tutkitut viranomais tahot (EMA 2010; FDA 2003 ja WHO 2006) ovat yleisesti samaa mieltä siitä, että bioekvivalenssiarvion tulisi ensisijaisesti pohjautua yksinomaan varsinaiseen

lääkeaineeseen. Tilanteet, milloin edellytetään metaboliitin määrittämistä, vaihtelevat kuitenkin edellä esitetyistä tilanteista.

Aikaisempi EMA:n ohjeisto (2002) suositteli metaboliittien käyttöä kahdessa tilanteessa. Ensiksi, kun varsinaisen lääkeaineen pitoisuus oli liian alhainen mitattavaksi luotettavasti (saattaisi aiheuttaa merkittävää variaatiota), ja toiseksi, kun metaboliitti vaikutti merkittävästi aktiivisuus/turvallisuusprofiiliin ja sen farmakokinetiikka oli epälineaarinen. Ensimmäistä tilannetta tarkennettiin vielä EMA:n 2006 julkaisemassa dokumentissa (Q&A 2006), jossa imeytymisnopeuden arvioimiseksi suositeltiin mittaamaan varsinaisen lääkeaineen C_{\max} -arvo, koska se saadaan usein mitattua, vaikka lääkeaineen AUC:ta ei kyettäisikään määrittämään täydellisesti. Tämä johtuu siitä, että metaboliitin C_{\max} ei ole yhtä herkkä erottamaan formulaatioeroja imeytymisnopeudessa. Metaboliitin AUC:n on kuitenkin ajateltu olevan hyväksyttävä mitta lääkeaineen AUC:sta tai imeytyneestä määrästä silloin, kun kinetiikka on lineaarista (Tucker ym. 1993 b). Toisessa tilanteessa (EMA 2002; 2006) vaadittiin molempien analyyttien määrittämistä ja niiden yksilöllistä arviointia suhteessa BE-kriteereihin (luottamusväleinen). Tämän lisäksi EMA (2002) vaati vakaan tilan tutkimuksia, kun lääkeaineen farmakokinetiikka oli epälineaarinen. Nämä vaatimukset herättivät kritiikkiä, koska ensinnäkin tieteellisten todisteiden puuttuessa oli epäselvää, miten formulaation katsottiin vaikuttavan metaboliitin epälineaarisuuteen. Lisäksi olisi toivuttu selkeämpää määritelmää siitä, milloin viranomaiset katsoivat metaboliitin vaikuttavan merkittävästi aktiivisuus/turvallisuusprofiiliin.

Uusimmassa EMA:n ohjeistossa (2010) korostetaan edellistä voimakkaammin parentin ainesosan käyttöä bioekvivalenssin määrittämisessä ja näin ollen metaboliittidatan käyttöä lääkeainedatan sijasta ei suositella tai se sallitaan vain poikkeustapauksissa. Jos analyysimenetelmän herkkyys on syy korvata lääkeaineen määrittäminen metaboliittimäärityksillä, vaaditaan siitä huolellinen perustelu, koska ko. tilanne on nykyään harvinainen analyysimenetelmien ollessa hyvin kehittyneitä ja herkkiä. Lisäksi ohjeisto oikeuttaa tarvittaessa myös suuremman lääkeannoksen käytön annetuin kriteerein. Kun metaboliittidataa käytetään varsinaisen lääkeainedatan sijasta muusta, kuin edellä mainitusta syistä, myös tällöin myyntiluvan hakijan tulee EMA:n (2010)

mukaan esittää riittävästi aineistoa, joka tukee sitä, että metaboliitin altistus vastaa varsinaisen lääkeaineen altistusta, ja että metaboliitin muodostuminen ei saturoidu terapeuttisilla annoksilla. Tämän tarkemmin aihepiiriin ei anneta ohjeistusta, vaan korostetaan myyntiluvan hakijan omaa harkintaa ja perusteluja valinnoille.

FDA:n ohjeisto (2003) suosittelee metaboliittien mittaamista bioekvivalenssin määrittämiseksi parentin ainesosan lisäksi, jos niitä muodostuu suolen seinämän tai muun pre-systeemisen metabolian kautta, ja jos metaboliitit vaikuttavat merkittävästi turvallisuuteen ja/tai tehoon. Ensimmäinen suositus perustuu todennäköisesti siihen, että CYP3A4 ja 3A5 entsyymejä esiintyy runsaasti proksimaalisessa ja distaalisisessa osassa suolistoa, tässä järjestyksessä (Pelkonen ym., 2001). Näin ollen, koska useimmat lääkeaineet ovat CYP3A4 entsyymien substraatteja, ko. entsyymi saattaa merkittävästi vaikuttaa näiden lääkeaineiden biologiseen hyötyosuuteen oraalisen annostelun jälkeen, erityisesti, jos lääkeaineen ensikierronmetabolia on voimakasta (verapamiili, midatsolaami ja siklosporiini) (Jackson ym. 2004). Edelleen, suolen metabolia saattaisi osoittaa, että muodostuneen metaboliitin määrä riippuu parentin lääkeaineen vapautumisesta lääkevalmisteesta (Jackson ym. 2004). Nimittäin nopea ja välittömästi tapahtuva lääkeaineen vapautuminen valmisteesta saattaisi aiheuttaa suolen metaboliaentsyymien saturoitumisen aiheuttaen parentin ainesosan kasvaneen biologisen hyötyosuuden. Sen sijaan lääkeaineen hidas vapautuminen valmisteesta johtaisi täydellisempään metaboliaan, ja lääkeaineen huonompaan hyötyosuuteen. Näin ollen, se osuus lääkeaineesta, joka selviää suolen pre-systeemiseltä metaboliialta, riippuu sekä nopeudesta, jolla lääkeaine vapautuu lääkevalmisteesta, että parentin aineosan imeytymisnopeudesta (Jackson ym. 2004).

Viime vuosina on kehitetty matemaattisia simulaatiomalleja, joiden avulla voidaan simuloida tutkittavien lääkevalmisteiden kulkeutumista elimistössä ja niistä vapautuneen lääkeaineen farmakokinetiikkaa ja osoittaa esimerkiksi kussakin tilanteessa herkin analyysi tai tutkimusmenetelmä (Fernández-Teruel 2009). Simulaatiolla saatuja tuloksia voidaankin hyödyntää, kun joudutaan perustelemaan valintoja viranomaistahoille (esim. metaboliittien käyttöä bioekvivalenssin osoittamisessa) (Fernández-Teruel 2009). Eräällä mallilla on osoitettu, että sellaisten lääkeaineiden

kohdalla, joilla esiintyy ei-saturoituvaa hepaattista ensikierronmetabolialia (ja systeemistä metaboliaa) varsinainen lääkeaine on yleensä herkin analyytti ja kertaannostutkimus herkin tutkimusasetelma havaitsemaan testiformulaation biofarmaseuttisessa laadussa olevat erot referenssivalmisteeseen nähden (Fernández-Teruel 2009). Samassa tutkimuksessa havaittiin harvinainen poikkeus, eli sellaiset BCS-luokan III lääkeaineet, joilla on alhainen ominaispuhdistuma. Niille lääkeaineen määrittäminen tasapainotilassa näyttäisi olevan herkin bioekvivalenssin mittari (Fernández-Teruel 2009). Tämä johtuu siitä, että kyseisten lääkeaineiden kohdalla on ajateltu esiintyvän epälineaarista kinetiikkaa rajoittuneesta imeytymisajasta tai imeytymisikkunasta johtuen.

4 ERITYISHUOMIOITA VAATIVAT SEIKAT BIOEKVIVALENSSITUTKIMUKSISSA

4.1 Kapean terapeuttisen leveyden lääkeaineet

Joillakin viranomaisilla on käytössä ainoastaan yhden bioekvivalenssin hyväksymisrajat (esim. FDA 2003). Lääkkeille, joilla on kapea terapeuttinen leveys (NTR, narrow therapeutic range) (kuva 4), kuten digoksiini, teofylliini ja karbamatsepiini, tämä saattaa tuottaa väärän positiivisen BE-tuloksen (Palylyk-Colwell ym. 1998). Päinvastaisessa tilanteessa, jossa lääkeaineella on laaja terapeuttinen ikkuna (oraaliset antibiootit, antasidit, antihistamiinit jne.), valmisteet saatetaan todeta yhteen hyväksymisrajaan perustuen ei-bioekvivalenteiksi, tässä tapauksessa farmakokinetiikan variaatiolla ei kuitenkaan olisi merkittävää vaikutusta kliiniseen lopputulokseen (Meredith 1996). Kaikesta huolimatta molempia tilanteita tulisi välttää, varsinkin kun ensimmäinen voi olla jopa vaarallinen.

NTR-lääkeaineiden terapeuttiset pitoisuustasot eivät juuri eroa toksisista, tai ei-tehokkaista lääkeainetasoista. Tämän takia melko pienetkin annosmuutokset saattavat johtaa suuriin, ja jopa merkittävästi erilaisiin, muutoksiin kliinisissä vaikutuksissa. FDA:n (FDA, Code of Federal Regulations, Section 320.33(c) 2003) mukaan lääkeaineella on kapea terapeuttinen leveys, jos kuolettavan annoksen mediaani ja tehokkaan annoksen mediaani arvojen välillä on alle kaksinkertainen ero, tai jos veren

alhaisimman toksisen konsentraation ja alhaisimman tehokkaan konsentraation välillä on alle kaksinkertainen ero.

Edellä kuvatun takia osa nykyisistä BE-ohjeistoista (FDA 2003) eivät välttämättä ole sopivia NTR-lääkeaineiden bioekvivalenssin arviointiin, koska sallittu 20–25% ero biologisessa hyötyosuudessa saattaa muuttaa näiden lääkeaineiden terapeuttisia vaikutuksia. Tästä ovat todisteena esimerkiksi lukuisat tutkimukset levotyrokksiinia (kilpirauhasen toimintaa estävä lääke) sisältävien valmisteiden bioekvivalenssista ja edelleen terapeuttisesta ekvivalenssista (Ozahowski ym. 1998; Reiffel ja Kowey 2000; Reiffel 2001). Tutkimustulokset ovat ristiriitaisia. Osassa formulaatiot olivat terapeuttisesti ekvivalentteja ja osassa potilailla esiintyi epänormaaleja THS arvoja, kun he vaihtoivat lääkeformulaatiosta toiseen. Tämä kaltaisten syiden takia monien tutkijoiden mielestä BE-kriteerit tulisikin olla lääkeainekohtaisia.

FDA:n nykyinen BE-ohjeisto (2003) suosittelee, että myyntiluvan hakijan tulisi olla yhteydessä sopivaan tarkastusosastoon, joka ratkaisee, pidetäänkö lääkeainetta NTR-lääkeaineena, jolloin myyntiluvan hakijan tulee harkita lisätestausta ja/tai kontroleja varmistaakseen kyseisten lääkevalmisteiden laadun. Ohjeisto (FDA 2003) suosittelee NRT-lääkeaineiden kohdalla perinteisiä BE-rajvoja 80–125% bioekvivalenssia kuvaaville parametreille (AUC ja C_{max}), ellei muuta ole osoitettu spesifillä ohjeistolla. Nimittäin, tiedeyhteisöjen kritiikin myötä ja bioekvivalenssitutkimuksiin liittyvien yleisohjeiden ollessa monissa tapauksissa riittämättömiä ja epätarkkoja FDA on julkaissut luonnoksen (2007a) yleisperiaatteista spesifeille (ongelmallisille) lääkeaineille tarkoitetuista BE-ohjeistoista. FDA on julkaissut (suuriosa v. 2009) näitä yksittäisille lääkeaineille tarkoitettuja BE-ohjeistoja kotisivuillaan (tällä hetkellä 532), NTR-lääkeaineet kuuluvat näihin lääkeaineisiin.

Jo vanhemmassa EMEA:n BE-ohjeistossa (EMEA 2002) on mainittu, että tietyissä tapauksissa (mm. NRT) BE-hyväksymisrajvoja saatetaan joutua tiukentamaan. Tarkempaa ohjetta (paljonko) ei kuitenkaan ole annettu. Uudessa BE-ohjeistossa (2010) asiaa tarkennettiin. NRT-lääkeaineiden kohdalla AUC- ja C_{max} -parametreille asetettiin hyväksymisrajaksi 90.00–111.11 %. Ohjeistossa kuitenkin todetaan, ettei ole

mahdollista asettaa kriteereitä sille, milloin kyseessä on kapean terapeuttisen leveyden lääkeaine ja tämä tulee päättää tapauskohtaisesti kliinisen harkinnan mukaan. Tämä voi jatkossa aiheuttaa epäselvyyttä lääketeollisuudessa.

4.2 Lääkeaineet/valmisteet, joilla esiintyy runsaasti variaatiota

Määritelmä lääkeaineille, joilla esiintyy farmakokineettisen datan runsasta yksilönsisäistä vaihtelua, on seuraava: ”Lääkeaineet, joilla esiintyy yksilönsisäistä vaihtelua $> 30\%$ (CV_{ANOVA}), luokitellaan korkean variaation lääkeaineiksi (HVD, ”highly variable drugs”) (McGilveray 1995). Bioekvivalenssin määrittäminen näille lääkeaineille on haastavaa (Buice ym. 1996; Tsang ym. 1996), ja aihepiiri on herättänyt runsaasti keskustelua (Blume ja Midha 1993; Shah ym. 1996).

Ehkä tärkein seuraus suuresta yksilönsisäisestä vaihtelusta on se, että tutkimuksiin tarvitaan suuri määrä tutkittavia, jotta saataisiin riittävä tilastollinen voima (jopa tilanteissa, jolloin lääkevalmisteet todella ovat bioekvivalentteja). Bio-International konferenssissa vuonna 1992 (Blume ja Midha 1993) ehdotettiin (Blume ym. 1995), että HV-lääkeaineita tutkittaisiin vakaassa tilassa. Ehdotus syntyi kokemuksesta, jota oli karttunut useista BE-tutkimuksista (Blume ja Midha 1995).

FDA:n ja AAPS järjestämän workshopin (Crystal City, Arlington, VA, March 6-8, 1995) jälkeen julkaistiin raportti, jossa esitettiin, että joillekin HV-lääkeaineille ja lääkevalmisteille (HVDP, highly variable drug products), bioekvivalenssi standardia tulisi muokata muuttamalla BE-rajoja, kuitenkin säilyttäen nykyisen 90 % luottamusvälin. Tarkoituksena oli skaalata viranomaisten asettamat kriteerit keskiarvolähtöiselle bioekvivalenssille (the method of scaled average bioequivalence, SABE) perustuen siihen yksilönsisäiseen vaihteluun, mitä esiintyy referenssivalmisteella, säilyttäen näin samalla kuluttajariskin 5 %:ssa (Schall 1995; Tothfalusi 2001; Midha ym. 1999). Menetelmän todistettiin vähentävän tutkittavien määrää BE-tutkimuksessa (Tothfalusi 2001), mutta se vaatii arviota yksilönsisäisestä vaihtelusta. Arvion teko voi olla haastavaa, sillä testi- vs. referenssivalmisteen kahden periodin vaihtovuoroisessa tutkimusasetelmassa jäännösvirhetermi sisältää seuraavat komponentit: yksilönsisäinen variaatio ADME-ominaisuuksissa (sisältää analyysissa

esiintyvän variaation), formulaationsisäinen variaatio (tablettien välinen variaatio), tutkittavan ja formulaation interaktio ja muut satunnaiset variaatiot (eivät selity ANOVA mallilla). Jos lääkeainetta annetaan liuksena kahteen eri aikaan vaihtovuoroisessa tutkimusasetelmassa, jäännösvirhe ei sisällä formulaationsisäistä variaatiota, eikä komponenttia subjektin ja formulaation välisestä interaktiosta. Toisin sanoen, jäännösvirhe kertoo yksilönsisäisen variaation. Näin ollen pilotti-tutkimus liuksella saattaisi olla käyttökelpoinen HV-lääkeaineiden kohdalla, koska sen avulla saataisiin arviot subjektinsisäisestä variaatiosta, ja tietoa voitaisiin edelleen hyödyntää BE-hyväksymisrajojen skaalauksessa. SABE-menetelmän heikkoutena kuitenkin on, että vaikka skaalatut BE-kriteerit helpottavat BE-vaatimuksia HV-lääkeaineille, mutta se asettaa tiukemmat rajat lääkeaineille, joilla variaatiota ei juuri esiinny, ja joilla on laaja terapeutinen leveys (Midha ym. 2005; Midha ym. 1998).

Myös rajattua näytteenottomenetelmää (The limited sampling method, LSM) (Jackson 2001) ja metaboliittien arviointia (Jackson 2000) on ehdotettu runsaasti varioivien lääkeaineiden bioekvivalenssin määrittämiseen. Tutkijat ovat kuitenkin todenneet ko. menetelmien olevan hyödyllisiä vain hyvin rajallisissa tapauksissa (Jackson 2000; 2001).

Myöhemmin jatkaakseen vuonna 1995 aloitettua keskustelua skaalatuista BE-hyväksymisrajoista HV-lääkeaineiden kohdalla FDA:n asiantuntijatyöryhmä järjesti uuden symposiumin 2005 (an AAPS symposium). Sen pohjalta FDA:n työryhmä teki simulaatiotutkimuksia, jossa se vertaili annetun tutkimusasetelman statistista tehoa käyttäen sekä skaalattuja, että ei-skaalattuja keskiarvolähtöisen bioekvivalenssin hyväksymisrajoja. Nykyisin, näiden tutkimusten, ja niihin tehtyjen tarkennusten pohjalta (Sam ym. 2008), FDA hyväksyy HV-lääkeaineiden bioekvivalenssin määrittämisen menetelmiksi perinteisen keskiarvolähtöisen bioekvivalenssin tai yksilöllisen bioekvivalenssin määrittämisen (IBE) (Benet 2006). Myyntiluvanhakijan tulisi harkita myös keskiarvolähtöisen bioekvivalenssin skaalausta. IBE-menetelmän mukaan geneerisen valmisteen bioekvivalenssin määrittämiseksi viranomaisten tulisi vertailla referenssi- ja testivalmisteen vaihtokelpoisuutta yksittäisessä henkilössä toistuvilla yksilönsisäisillä havainnoilla. Tämän takia, testi- ja referenssivalmisteen

kineettisten ominaisuuksien eroja, kuten AUC tai C_{\max} , tulisi verrata referenssivalmisteiden vastaaviin eroihin (referenssivalmiste annettu kahteen eri aikaan). Toisin sanoen, tulee määrittää (T-R)/(R-R) suhde.

EMA:n vanhassa BE-ohjeistossa (2001) suositeltiin C_{\max} -parametrin BE-hyväksymisrajojen laajentamista (esim. 75–133%) tietyissä tapauksissa (esim. HV-lääkeaineiden kohdalla), jos asiaan ei liittynyt turvallisuuteen tai tehoon vaikuttavia tekijöitä. Uuden tutkimustiedon valossa myös EMA on tehnyt päivityksiä BE-ohjeistonsa (2010) ja käsittelee voimakkaasti varioivia lääkeaineita tai lääkevalmisteita aikaisempaa seikkaperäisemmin. Myös EMA määrittelee runsaan variaation lääkevalmisteiksi sellaiset, joiden yksilönsisäinen variaatio parametrille on yli 30 %. Jos myyntiluvanhakija epäilee, että lääkevalmiste kuuluu tähän kategoriaan imeytymisen nopeuden ja/tai imeytyneen määrän suhteen, annetaan oikeutus järjestää toistotutkimus vaihtovuoroisella tutkimusasetelmalla. On hyväksyttävää suorittaa joko 3-periodin tai 4-periodin vaihtovuoroinen toistotutkimus.

HV-lääkevalmisteille, joiden C_{\max} -arvon runsas variaatio ei aiheuta kliinisesti merkittäviä vaikutuksia, voidaan määrittää bioekvivalenssi laajennetuilla hyväksymisrajoilla (EMEA, 2010). Tämä tarkoittaa, että C_{\max} :n hyväksymiskriteerit voidaan laajentaa olemaan korkeintaan 69.84–143.19. Tällöin bioekvivalenssitutkimuksen tulee olla vaihtovuoroinen, ja siinä on todistettava, että yksilönsisäinen vaihtelu referenssivalmisteen C_{\max} -arvossa on yli 30 %. Lisäksi on myös todistettava, että laskettu yksilönsisäinen vaihtelu on luotettava arvio, ja että se ei johdu poikkeavasta havainnosta. Hakemus laajennetuista hyväksymisrajoista tulee ennalta määritellä tutkimusprotokollassa.

Hyväksymisrajojen laajennuksen suuruus määritellään siihen yksilönsisäiseen vaihteluun perustuen, mikä havaitaan BE-tutkimuksessa, käyttäen skaalattu-keskiarvo-bioekvivalenssia (scaled-average-bioequivalence) (laskukaava BE-ohjeistossa). Ohjeistossa (EMEA 2010) on myös esitetty taulukossa esimerkkejä siitä, miten ko. menetelmän käyttö eri variaatitasoilla vaikuttaa hyväksymisrajoihin. Hyväksymisrajojen laajennus ei kuitenkaan koske AUC-arvoja, vaan hyväksymisrajat

sen kohdalla noudattaa kaikissa tapauksissa perinteistä raja-asteikkoa 80.00–125.00 % (EMEA 2010).

WHO (2006) kuvaa BE-ohjeistossaan joitakin menettelytapoja, joita käytetään tärkeimpien viranomaistahojen ohjeistoissa (EMEA, FDA ja JAPANI). WHO esittää, että maan viranomaistahon tulisi omaksua joku näistä menettelytavoista säädelläkseen runsaasti varioivien farmaseuttisten valmisteiden myyntilupia.

4.3 *In vitro* tutkimukset ja *in vivo* bioekvivalenssitutkimusten biowaiver

Useimmiten *in vitro* -dissoluutiotutkimukset vaaditaan tehtäväksi *in vivo* -BE-kokeita täydentämään. Niitä käytetään myös oikeuttamaan lääkevalmisteiden eri vahvuuksien biowaiver (kuvattu edellä). Lisäksi, dissoluutiotutkimusten ehkä tärkein rooli lääkevalmisteiden bioekvivalenssia ajatellen on BCS-biowaiver *in vivo* -BE-tutkimuksille. Viimeistä on esitelty seuraavassa yksityiskohtaisemmin

FDA oli ensimmäinen viranomainen (1977), joka julkaisi ohjeiston biologisen hyötyosuuden ja bioekvivalenssin tutkimisesta uusille lääkevalmisteille. Kuten sanottua, uuden lääkeaineen ja lääkevalmisteiden kehityksessä tarvitaan useita biologisen hyötyosuuden ja bioekvivalenssin tutkimuksia. Aikaisemmin lääkevalmisteiden terapeuttisen bioekvivalenssin todistamiseksi tarvittiin lähes poikkeuksetta *in vivo* -BE-tutkimuksia. Ne kuitenkin vievät aikaa ja ovat kalliita. Lisäksi *in vivo* tutkimuksiin liittyy tietynlainen riski haittavaikutuksista terveillä vapaaehtoisilla. *In vivo* -BE-tutkimusten tarvetta haluttiinkin vähentää, ja asian ratkaisemiseksi annettiin ehdotus, että tietyissä tapauksissa *in vitro* -dissoluutiokokeet voitaisiin suorittaa niiden sijaan (biowaiver). Samalla esiteltiin myös biofarmaseuttinen luokittelujärjestelmä (BCS, the biopharmaceutical classification system) (Amidon ym. 1995). Lopulta vuodesta 1995 FDA on hyväksynyt joitakin tuotantomittakaavan ja myyntiluvan jälkeisiä muutoksia dissoluutiotutkimusten perusteella (FDA 1995). Tätä täydentämään FDA julkaisi v. 1997 viranomaisohjeiston *in vitro*-*in vivo* -korrelaatioille (FDA 1997b). EMA:lta ilmestyi vastaavat ohjeistot 2000 (EMEA 2000). FDA:n ja EMA:n ohjeistot sallivat, että dissoluutiotutkimuksilla ja tason A IVIVC-malleilla voidaan tietyissä tilanteissa korvata BE-tutkimukset, vaikka lääkevalmistetta olisi merkittävästi muunneltu.

Vuonna 2000 FDA julkaisi viranomaisohjeiston BCS-biowaivereista (FDA 2000). Se sisältää yksityiskohtaiset ohjeet, kuinka lääkeaineet luokitellaan BCS:n mukaisesti, sekä ehdot BCS-biowaiverin käytölle suurten lääkevalmistemuutosten tapauksessa, tai kehitettäessä uutta geneeristä välittömästi lääkeaineen vapauttavaa lääkevalmistetta. Ohjeiston mukaan BCS-biowaiver on mahdollinen luokan I lääkeaineiden tapauksessa, koska näiden lääkeaineiden imeytyminen on täydellistä ja dissoluutio nopeaa, eli yli 85 % tulisi liueta 30 minuutissa kolmessa eri pH:ssa (välillä 1-6.8) (FDA 2000). Kuvattujen kriteerien täytyessä näiden lääkeaineiden *in vivo* -BE-tutkimukset voidaan korvata *in vitro* -kokeilla, jos testi ja referenssi lääkevalmisteilla ovat samanlaiset dissoluutioprofiilit. Myöhemmin EMA omaksui samat periaatteet päivittäessään BE-ohjeistoaan v. 2002 (EMA 2002).

Jotta tietty lääkeaine voisi olla biowaiver-kandidaatti, hakemukseen tulee liittää asian todistamiseksi tieteelliset perustelut, eli mm. lääkeaine ei ole kapean terapeuttisen leveyden lääkeaine, kaikki apuaineet formulaatiossa ovat hyvin tunnettuja ja apuaineet eivät saa vaikuttaa lääkeaineen farmakokinetiikkaan (FDA 2002; EMA 2002). Myös tilanteissa, jolloin apuaineita on epätyypillisen paljon lääkeformulaatiossa, viranomaiset vaativat asiasta lisätietoja myyntilupahakemuksessa.

FDA:n ja EMA:n BE-ohjeistoissa on pieniä eroja BCS-metodologiassa ja siinä, mihin ja milloin sitä voidaan hyödyntää (Gupta ym., 2006). Lääkeaineella on hyvä liukoisuus, jos suurin annosvahvuus liukenee 250 ml vesipohjaista puskuriliuosta. FDA:n ohjeiston mukaan liukoisuus tulisi mitata pH välillä 1-7.5, mutta EMA:n ohjeistossa (2010) vaaditaan pH väliä 1-6.8, ja lisäksi lääkeaineen pKa:ssa, mikäli se on kyseisellä pH välillä. Lääkeaineen permeabiliteetin katsotaan olevan suuri, jos 90 % tai enemmän oraalisesti annostellusta lääkeaineesta imeytyy (FDA 2000). EMA:n ohjeistossa (2010) täydellisen imeytymisen katsotaan merkitsevän hyvää permeabiliteettia, eli käytännössä, kun lääkeaineen mitattu imeytynyt määrä on ≥ 85 %. Aikaisemmassa EMA:n ohjeistossa (2002) hyvän imeytymisen tapauksessa edellytettiin myös lineaarisuutta. EMA vaatii, että lääkeaineen imeytymisen perustelut tulee pohjautua luotettaviin ihmisillä tehtyihin tutkimuksiin (data absoluuttisesta hyötösuudesta tai

massatasapainosta). Menetelmät on selitetty yksityiskohtaisesti. FDA antaa monipuolisemmat vaihtoehdot permeabiliteetin määrittämiseksi. EMA:n antamien menetelmien lisäksi, FDA oikeuttaa myös *in situ* -ja *in vitro* -menetelmien käytön (suolen permeaatio menetelmät *in vivo*, *in situ* tai *in vitro* jne.).

EMA:n uuteen ohjeistoon (2010) on tullut joitakin uudistuksia biowaiver-kriteereihin. Ensinnäkin BCS-luokitukseen perustuva biowaiver on mahdollinen lääkeaineille, joiden on todistettu olevan hyvin liukenevia ja imeytyvän täydellisesti, tämä pätee luokan I lääkeaineisiin. Lisäksi *in vitro* -dissoluution tulee olla näiden lääkeaineiden kohdalla, joko hyvin nopeaa (> 85 % 15 minuutissa) tai yhtä nopeaa (85 % 30 minuutissa). Jos *in vitro* -dissoluutio on hyvin nopeaa, dissoluutioprofiilien samankaltaisuuden todistamiseksi ei tarvita erikseen matemaattisia laskelmia, sen sijaan jos se on yhtä nopeaa, tulee profiileille laskea samankaltaisuuden todistamiseksi sitä kuvaava f_2 -kerroin.

Uuden ohjeiston mukaan BCS-luokitukseen perustuva biowaiver on mahdollinen lääkeaineille tietyin ehdoin myös luokan III lääkeaineille. Tällöin tulee olla todistettu, että lääkeaine on hyvin liukeneva, ja rajallisesti imeytyvä. Juuri näiden lääkeaineiden imeytymisen rajallisuuden takia, ne soveltuvat biowaivereiksi vain, jos tietyt (tiukemmat) kriteerit koskien lääkevalmisteen koostumusta ja *in vitro* -dissoluutiota täyttyvät. Yleisesti molempien BCS-luokkien (I ja III) lääkeaineiden kohdalla mahdollisesti biologiseen hyötyosuuteen vaikuttavien apuaineiden kvantitatiivinen ja kvalitatiivinen koostumus tulee olla sama. BCS-luokan III lääkeaineiden tapauksessa kuitenkin myös muiden apuaineiden tulee olla kvalitatiivisesti samoja ja kvantitatiivisesti hyvin samankaltaisia. Tämä johtuu siitä, että voidaan sulkea pois erilaiset membraani-transporttereiden vaikutukset. Muutenkin BCS II tapauksessa on tarkasteltava biowaiver sopivuutta kriittisesti, esim. vaikutukset aluekohtaiseen imeytymiseen. Lisäksi näillä lääkeaineilla dissoluution on oltava aina hyvin nopeaa (> 85 % 15 minuutissa).

Viranomaiset ovat vastaanottaneet biowaiveriin pohjautuvia generisten oraalisten lääkevalmisteiden hakemuksia odotettua vähemmän (Barends, 2005), koska BCS-

biowaiver -kriteerit on koettu yleisesti melko tiukoiksi. Tämä koskee erityisesti uusia generisiä lääkevalmisteita (Polli ym., 2004; Barends, 2005; Gupta ym., 2006, EMEA, 2007). Asian korjaamiseksi kirjallisuudessa on esitetty useita julkaisuja, joissa BCS-biowaiver -kriteereihin on ehdotettu tieteellisin perusteluin tiettyjä muutoksia. Esimerkiksi, on ehdotettu, että BCS-biowaiver laajennettaisiin koskemaan myös luokan II happamia lääkeaineita (Rinaki ym., 2004; Yazdanian ym, 2004), sekä BCS-luokan III lääkeaineita (Blume and Schug, 1999; Yu ym., 2002; Cheng ym., 2004; Vogelpoel ym., 2004; Polli ym., 2004). Lisäksi biowaiver-kandidaattien liukoisuusrajat voitaisiin fysiologiaan perustuen kaventaa pH-välistä 1-7.5 koskemaan pH-väliä 1-6.8, ja tutkimusten mukaan lääkannoksesta imeytyvän osuuden suuruuden kriteeri voitaisiin pienentää 90 %:sta 85 %:iin (Yu ym., 2002; Polli ym., 2004). Lisäksi esimerkiksi FDA:n ohjeiston (FDA 2000) mukaan lääkevalmistetta pidetään nopeasti liukenevana, jos yli 85 % liukenee 30 min ja EMEA:n ohjeistossa kriteerit ovat tätäkin tiukemmat (15 min) (EMEA 2010). Uudeksi kriteeriksi liukenemisajalle on ehdotettu jopa 60 minuuttia (Polli ym 2004). Osa näistä kritisoiduista aihepiireistä onkin korjattu tai tarkennettu EMEA:n uuteen ohjeistoon (2010), minkä toivotaan lisäävän BCS-biowaiveriin pohjautuvien hakemusten määrää.

Myös WHO on aktiivisesti hyödyntänyt BCS-biowaivereita (WHO 2006). Kehitysmaissa tarvitaan uusia, halpoja, tehokkaita ja turvallisia lääkevalmisteita. Kansanvälinen farmaseuttinen keskusjärjestö (FIP) on tuottanut sarjan julkaisuja tiedelehdessä, the Journal of Pharmaceutical Sciences. Julkaisuissa tarkastellaan, voisivatko WHO:n listaamat ”välttämättömät lääkeaineet” (essential drugs) olla uusia BCS-biowaiver -ehdokkaita.

5 BIOEKVIVALENSSITUTKIMUSTEN HAASTEET TULEVAISUUDESSA

Perinteinen lääkekehitys on turvautunut enimmäkseen empiirisiin ja/tai toistuviin prosesseihin (Lionberger 2008). Farmaseuttisten tieteiden ja teknologian modernisoituessa sekä uusien annosmuotojen ja annostelujärjestelmien (esim. liposomit, nanoteknologia) tullessa markkinoille suunnitelmallisempien lähestymistapojen käyttö saattaisi kuitenkin jatkossa olla käytännöllisempää. Lisäksi, vaikka monille

lääkevalmisteille on olemassa geneerisiä vaihtoehtoja, on olemassa tiettyjä lääkeaine/lääkevalmisteryhmiä, joille rinnakkaislääkevalmisteiden kehitys on ollut selvästi vähäisempää, ellei olematonta. Kautta aikojen eri tahojen (mm. lääkärit ja potilaat) toimesta on myös epäilty, onko geneerinen lääkevalmiste kaikissa tapauksissa samankaltainen alkuperäisvalmisteen kanssa. Kaikkiin edellä mainittuihin seikkoihin löytyy tausta geneerisen lääkevalmisteen keskeisimmistä kehitysvaiheista (Lionberger 2008).

Aluksi, geneerisen kopion aikaansaamiseksi, referenssivalmiste on karakterisoitava hyvin. Tämä on kuitenkin haastavaa sellaisille referenssivalmisteille, jotka ovat yhdistelmävalmisteita, tai jotka sisältävät yhdistelmä-lääkeainetta (peräisin luonnosta, polydispersio sekoitukset, supra-molekulaariset yhdistelmä-rakenteet). Seuraavaksi on suunniteltava lääkevalmisteen formulaatio siten, että siitä saataisiin farmaseuttisesti ekvivalentti ja bioekvivalentti referenssivalmisteen kanssa. Suunnittelussa tulisi kyetä tunnistamaan myös uusien ja nykyisin entistä monimutkaisempien annosmuotojen tai yhdistelmäannosmuotojen ominaisuuksia (inhalaatiot, iholaastarit, nenäsumutteet ja säädellysti lääkeainetta vapauttavat mekanismit). Kehitetyn testivalmisteen bioekvivalenssin todistamiseksi referenssivalmisteeseen nähden tarvitaan useimmiten *in vivo* -BE-tutkimuksia. Niiden kohdalla monet lääkeyritykset yrittävät välttää sellaisia, jotka ovat kalliita, laajoja tai huonosti ennustettavia (runsaasti varioivat lääkeaineet, paikallisesti vaikuttavat lääkeaineet ja laitteiden toimintakyvyn testaus). Lääkeyritykset eivät ole myöskään halukkaita suorittamaan työläitä kliinisiä seurantatutkimuksia, joiden päätetapahtumalla todistetaan bioekvivalenssi. Lopuksi, geneeristen lääkevalmisteiden tuotannossa, tiettyjen uusien annosmuotojen kohdalla saattaa tulla ongelmia siirryttäessä teolliseen mittakaavaan (vaihtelu prosessissa, spesifikaatiot eivät täyty, hukkaan menneet kauppaerät). Ongelmat saattavat johtaa uuden formulaation kehittämiseen tai valmistusprosessin jatkokehitykseen, mistä seuraa resulsikuluja.

Näin ollen, on olemassa useita mahdollisuuksia, joissa tieteen kehittyminen voisi nopeuttaa geneeristen lääkevalmisteiden kehitystä ja myyntilupien hyväksymistä, sekä laajentaa geneeristen lääkevalmisteiden terapia-alueita, samalla säilyttäen niiden korkean laadun, turvallisuuden ja tehokkuuden. Tässä yhteydessä monet lääkekehitystä

ja valmistusta valvovat viranomaistahot ovat suositelleet ”laatua suunnittelulla”-menetelmän (Quality by design, QbD) käyttöä (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH 2007). Tämä menettelytapa lähtee liikkeelle ennalta asetetuista tavoitteista ja päämääristä, ja siinä korostetaan farmaseuttisen valmisteen, valmistusprosessin ja prosessikontrollin aikaisempaa parempaa ymmärrystä, tieteeseen ja laaturiskien hallintaan perustuen (ICH 2007). QbD-menetelmän avulla saadaan aikaiseksi laadukas lopputuote suunnittelemalla ennalta formulaatiot ja prosessit siten, että kliinisiin hoitotuloksiin vaikuttavat lääkevalmisteen laatuominaisuudet täyttyvät (Woodcock 2004). Menetelmässä hyödynnetään mallinnustekniikoita ja simulaatioita formulaation toimivuuden ja lääkeaineen imeytymisen ennustamisessa. Tuloksia voidaan hyödyntää formulaation ja tulevien kokeellisten tutkimusten suunnittelussa. Myös dissoluutiokokeilla ja IVIVC-korrelaatiolla mitataan lääkevalmisteen kehityskulkua, mutta näiden menetelmien käyttö on kuitenkin rajoitettu vain tiettyihin tapauksiin.

Myös paikallisesti vaikuttavien lääkeaineiden bioekvivalenssin tutkimiseen on kehitetty uusia toimivampia menettelytapoja (FDA 2007b ja EMEA 2010). Uusia menetelmiä paikallisesti vaikuttaville lääkevalmisteille ovat mm.: kuvastamistekniikat, näytteenotto kohdekudoksesta, uudet farmakodynaamiset päätetapahtumat (biomarkkerit), ja uudet tutkimusasetelmat kliinisten päätetapahtumien tutkimuksissa. Lisäksi mallinnusta ja simulaatioita voitaisiin hyödyntää entistä enemmän myös näiden valmisteiden kohdalla.

6 YHTEENVETO

Bioekvivalenssi (BE) on helposti osoitettavissa oraalisille lääkevalmisteille, jotka sisältävät hyvin systeemiseen verenkiertoon imeytyviä lääkeaineita, jotka säilyvät imeytyessään muuttumattomina, ja joilla ei esiinny voimakasta variaatiota. Sen sijaan monille lääkevalmisteille, joiden lääkeaineella esim. esiintyy laajaa yksilönsisäistä vaihtelua, tai joiden lääkeaine vaikuttaa paikallisesti, bioekvivalenssin määrittäminen ja aikaansaaminen on haastavampaa. Samantyyllisiä haasteita aiheuttaa myös kapean terapeuttisen leveyden lääkeaineet, lääkeaineet, joilla esiintyy geneettistä polymorfiaa

metaboliassa, sekä biologiset ja endogeeniset lääkeaineet jne. Edellä mainituissa ja tietyissä tutkimuksen suoritukseen liittyvissä aihepiireissä (bioekvivalenssin määrittämisessä käytetyn ainesosan (parentti vs. metaboliitti) valinta, ruuan kanssa tehtävien BE-tutkimusten toteutus, *in vivo* -BE-tutkimusten biowaiver-kriteerit jne.) esiintyy kiistanalaisuutta tutkijoiden keskuudessa. Tämä saattaa edelleen vaikeuttaa bioekvivalenssin määrittämistä kahden lääkevalmisteen välillä.

Eri viranomaistahojen bioekvivalenssiohjeistoja vertailtaessa havaittiin, että ohjeistoissa esiintyvät eroavaisuudet liittyvät monissa tapauksissa juuri näihin edellä kuvattuihin ratkaisemattomiin kysymyksiin, ja ongelmakohtiin.

Alkuperäisvalmisteen ja vaihtokelpoisen rinnakkaisvalmisteen bioekvivalenssin ja farmaseuttisen ekvivalenssin vaatimusten harmonisointi olisi tärkeää, sillä nykyisin on saatavissa lisääntyvässä määrin heikkolaatuisia, väärennettyjä, ja luvattomia apuaineita sisältäviä lääkevalmisteita ja toisaalta on olemassa yhteiskunnallinen paine lääkekustannusten supistamiseen. Jotta harmonisointi voisi toteutua, on olennaisen tärkeää saada aikaan maailmanlaajuisia keskusteluita viranomaisten, teollisuuden ja akateemisen alan tutkijoiden kesken. Keskustelussa olisi hyvä selvittää bioekvivalenssin tutkimusmenetelmiin liittyviä epäkohtia ja ongelmakohtia, ja kehittää uusia ratkaisuja. Tällä hetkellä viranomaistahot etenevät bioekvivalenssin tutkimusmenetelmien kehityksessä kukin omalla tahollaan muiden jäädessä ajoittain, ainakin tilapäisesti, jälkeen ennen bioekvivalenssiohjeistojen päivitystä.

Useimmiten käytössä olevat bioekvivalenssin tutkimusmenetelmät ovat etupäässä olleet kokeellisia *in vitro* - ja *in vivo* -menetelmiä. *In silico* -menetelmiä hyödynnetään niiden potentiaalista huolimatta suhteellisen vähän. Laskennallisten tietokonemenetelmien käyttö kuitenkin edesauttaisi geneeristen lääkevalmisteiden valmistajia identifioimaan entistä paremmin sellaiset lääkevalmisteen formulaatioon ja valmistukseen liittyvät tekijät, joita tulee säädellä, jotta tutkittavista lääkevalmisteista (testi vs. referenssi) saataisiin bioekvivalentit. Tämä takaisi myös geneeristen valmisteiden hyvän laadun. Mekanistinen ymmärrys siitä, miten lääkeaineen ja apuaineiden fysikaaliset ominaisuudet vaikuttavat valmisteen ominaisuuksiin, auttaisi valitsemaan apuaineet

rationaalisesti, jolloin ei tarvitsisi valmistaa suurta määrää eksperimentaalisia formulaatioita ja edelleen, järjestää turhia *in vivo* -tutkimuksia (eettisestikin väärin). Tulevaisuudessa matemaattisen mallinnuksen ja simuloinnin käyttöä tulisi lisätä bioekvivalentin lääkevalmisteen suunnittelussa, kuin myös *in vivo* -BE-tutkimuksen suunnittelussa, ja myyntiluvan hyväksymisprosessissa. Simulaatiomalleja voitaisiin hyödyntää myös bioekvivalenssitutkimuksen riskiarviossa.

7 KIRJALLISUUSLUETTELO

American Association of Pharmaceutical Sciences (AAPS), Symposium on "Bioequivalence of Highly Variable Drugs and Drug Products", Nashville, TN, Nov 9, 2005

Amidon GL, Lennernas H, Shah VP, Crison JR: A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharm Res* 12: 413-420, 1995

Barends DM: Application and experience in the EU of BCS in the review of new generics. *J Pharm Pharmacol* 57: 117, 2005

Benet LZ: Therapeutic Considerations of Highly Variable Drugs. Meeting of FDA Committee for Pharmaceutical Science, October 6, 2006. Haettu 27.5.2009 Internetistä: http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/06/slides/20064241s2_2_files/frame.htm

Blume HH, Midha KK. Bio-International 92, Conference on Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies. *J Pharm Sci* 11: 1186-1189, 1993

Blume HH, Midha KK: Report of consensus meeting: Bio-International 94, conference on bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *Eur J Pharm Sci* 3: 113-24, 1995

Blume HH, Schug BS: The biopharmaceutics classification system (BCS): Class III drugs better candidates for BA/BE waiver? *Eur J Pharm Sci* 9: 117-121, 1999

Blume HH, Elze M, Pottha ST, Schug BS: Practical strategies and design advantages in highly variable drug studies: Multiple dose and replicate administration design. Kirjassa Biointernational 2 Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies, s. 117-122. Toim. Blume HH, Midha KK, Stuttgart, editors. Medpharm Scientific Publishers, Germany 1995

Blume H, Schug B, Tautz J, Erb K: New guidelines for the assessment of bioavailability and bioequivalence. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 48: 548-555, 2005

Buice RG, Subramanian VS, Duchin KL, Uko-Nne S: Bioequivalence of a highly variable drug: An experience with nadolol. *Pharm Res* 13: 1109-1115, 1996

Central Drugs Standard Control Organization, 2005. Guidelines for Bioavailability & Bioequivalence Studies (CDSCO, New Delhi, India)

Charman WN, Porter CJ, Mithani S, Dressman JB: Physicochemical and physiological mechanisms for the effects of food on drug absorption: role of lipids and pH. *J Pharm Sci* 86: 269-282, 1997

Chen ML, Jackson AJ: The role of metabolites in bioequivalency assessment: I: Linear pharmacokinetics without first-pass effect. *Pharm Res* 8: 25-32, 1991

Cheng C-L, Yu LX, Lee H-L, Yang C-Y, Lue C-S, Chou C-H: Biowaiver extension potential to BCS class III high solubility-low permeability drugs: bridging evidence for metformin immediate-release tablets. *Eur J Pharm Sci* 22: 297-304, 2004

Elkoshi Z, Behr D, Mirimsky A: Multiple-dose studies can be a more sensitive assessment for bioequivalence than single -dose studies: The case with omeprazole. *Clin Drug Invest* 22: 585-592, 2002

el-Tahtawy AA, Jackson AJ, Ludden TM: Evaluation of bioequivalence of highly variable drugs using Monte Carlo simulations. I. Estimation of rate of absorption for single and multiple dose trials using Cmax. *Pharm Res* 12: 1634-1641, 1995

el-Tahtawy AA, Jackson AJ, Ludden TM: Comparison of single and multiple dose pharmacokinetics using clinical bioequivalence data and Monte Carlo simulations. *Pharm Res* 11: 1330-1336, 1996

el-Tahtawy AA, Tozer TN, Harrison F, Lesko L, Williams R: Evaluation of bioequivalence of highly variable drugs using clinical trial simulations. II. Comparison of single and multiple- dose trials using AUC and Cmax. *Pharm Res* 15: 98-104, 1998

The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA), Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). Note for guidance on Quality of modified-release products: A: Oral dosage forms, B: Transdermal dosage forms section I Quality, 2000

The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA), Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). Note for Guidance on the Investigation of Bioavailability and Bioequivalence, 2002

The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA), Committee for medicinal products for human use (CHMP) / Committee for medicinal products for

veterinary use (CVMP). Guideline on stability testing for applications for variations to a marketing authorization, 2005

The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA), Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). Questions & Answers on the Bioavailability and Bioequivalence Guideline, 2006

The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA), Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Concept paper on BCS based biowaiver, 2007

The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA), Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). Guideline on the investigation of bioequivalence, 2010

Fernández-Teruel C, Gonzalez-Alvarez I, Navarro-Fontestad C, García-Arieta A, Bermejo M: Computer simulations of bioequivalence trials: Selection of design and analyte in BCS drugs with first-pass hepatic metabolism: Part II. Non-linear kinetics. Eur J Pharm Sci 36: 147-156, 2009

Gupta E, Barends DM, Yamashita E, Lentz KA, Harmsze AM, Shah VP, Dressman JB, Lipper RA: Review of global regulations concerning biowaivers for immediate release solid oral dosage forms. Eur J Pharm Sci 26: 315-324, 2006

Health Canada, 1997. Guidance for Industry: Conduct and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies—Part A: Oral Dosage Formulations Used for Systemic Effects (HC, Ottawa, Canada)

Health Canada, 2005. Guidance for Industry: Bioequivalence Requirements: Comparative Bioavailability Studies Conducted in the Fed State (HC, Ottawa, Canada)

Helsingin julistus, hyväksytty 1964 ja tarkistettu 2008. Haettu 07.01.2010 internetistä: <http://www.laakariliitto.fi/etiikka/helsinginjulistus.html>

ICH, 2007. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Draft Consensus Guideline on Pharmaceutical Development: Annex to Q8. November 1, 2007. <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA4349.pdf>

Jackson AJ: The role of metabolites in bioequivalency assessment, III: Highly variable drugs with linear kinetics and first-pass effect. Pharm Res 17: 1432-1436, 2000

Jackson AJ: Evaluation of a limited sampling method to determine the bioequivalence of highly variable drugs with long half-lives. Biopharm Drug Dispos 22: 179-190, 2001

Jackson A, Robbie G, Marroum P: Metabolites and bioequivalence past and present. Clin Pharmacokinet 43: 655-672, 2004

Ludden TM, Allerheiligen SR, Browne TR, Koup JR: Sensitivity Analysis of the Effect of Bioavailability or Dosage Form Content on Mean Steady State Phenytoin Concentration. *Ther Drug Monit* 13: 120-125, 1991

McGilveray JJ. An overview of problems and progress at Bio-Internationals '89 and '92. Kirjassa: *Biointernational 2 Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies*, ss. 109-115. Toim. Blume HH, Midha KK, Medpharm Scientific Publishers: Germany, Stuttgart 1995

Meredith PA: Generic drugs: Therapeutic equivalence. *Drug Saf* 15: 233-42, 1996

Meredith PA: Bioequivalence and other unresolved issues in generic drug substitution. *Clin Ther* 23:2875-2890, 2003

Midha KK, Hubbart JW, McKay G, Hawes EM, Hsia D: The role of metabolites in a bioequivalence study 1: loxapine, 7-hydroxyloxapine and 8-hydroxyloxapine. *Int J Clin Pharmacol* 31: 177-183, 1993.

Midha KK, Rawson MJ, Hubbard JW. Bioequivalence: Switchability and scaling. *Eur J Pharm Sci* 6: 87-91, 1998

Midha KK, Rawson MJ, Hubbard JW: Prescribability and switchability of highly variable drugs and drug products. *J Control Release* 62: 33-40, 1999

Midha KK, Rawson MJ, Hubbard JW: The role of metabolites in Bioequivalence. *Pharm Res* 21: 1331-1344, 2004

Midha KK, Rawson MJ, Hubbard JW: The bioequivalence of highly variable drugs and drug products. *Int J Clin Pharmacol Ther* 43: 485-498, 2005

Nation RL, Sansom LN: Bioequivalence requirements for generic products. *Pharmacol Ther* 62: 41-55, 1994

Ozahowski TP, Greenberg MI, Mock RP: Clinical in equivalence of generic and brand name type IA antiarrhyl. *Pacing Clin Electrophysiol* 21: 809, 1998

Palylyk-Colwell E, Jamali F, Dryden W, Friesen E, Koven S, Mohamed I, ym.: Bioequivalence and interchangeability of narrow therapeutic range drugs: Canadian Society for pharmaceutical sciences discussion. *J Pharm Pharm Sci* 1: 2-7, 1998

Pelkonen O, Boobis AR, Gundert-Remy U: In vitro prediction of gastrointestinal absorption and bioavailability: an experts' meeting report. *Eur J Clin Pharmacol* 57: 621-629, 2001

Polli JE, Yu LX, Cook JA, Amidon LA, Borchardt RT, Burnside BA, Burton PS, Chen M-L, Conner DP, Faustino PJ, Hawi AA, Hussain AS, Joshi HN, Kwei G, Lee VHL, Lesko LJ, Lipper RA, Loper AE, Nerurkar SG, Polli JW, Sanvordeker DR, Taneja R, Uppoor RS, Vattikonda CS, Wilding I, Zhang G. Summary workshop report:

Biopharmaceutics classification system- implementation challenges and extension opportunities. *J. Pharm. Sci.* 93: 1375-1381, 2004

Reiffel JA: Issues in the use of generic antiarrhythmic drugs. *Curr Opin Cardiol* 16: 23-29, 2001

Reiffel JA, Kowey PR: Generic antiarrhythmics are not therapeutically equivalent for the treatment of tachyarrhythmias. *Am J Cardiol* 85:1151-1153, 2000

Rinaki E, Dokoumetzidis A, Valsami G, Macheras P: Identification of biowaivers among class II drugs: theoretical justification and practical examples. *Pharm Res* 21: 1567-1572, 2004

Schall R: A unified view of individual, population, and average bioequivalence. *Kirjassa: Bio-International 2, Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetics*, ss. 91-106. Toim. Blume HH, Midha KK, Medpharm, Stuttgart 1995

Tothfalusi L, Endrenyi L, Midha KK, Rawson MJ, Hubbard JW: Evaluation of the bioequivalence of highly-variable drugs and drug products. *Pharm Res* 18:728-733, 2001

Tsang YC, Pop R, Gordon P, Hems J, Spino M: High variability in drug pharmacokinetics complicates determination of bioequivalence: Experience with verapamil. *Pharm Res* 13: 846-850, 1996

U.S. Code of Federal Regulations. Title 21, Part 320: Bioavailability and Bioequivalence Requirements. Section 320.33(c), 2003

U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for industry: Immediate-release solid oral dosage forms, scale-up and postapproval changes: Chemistry, manufacturing, and controls, in vitro dissolution testing, and in vivo bioequivalency documentation, 1995

U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for industry: Extended release oral dosage forms: development, evaluation, and application of in vitro/in vivo correlations, 1997a

U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for industry: Nonsterile semisolid dosage forms scale-up and postapproval changes: Chemistry, manufacturing, and controls; in vitro release testing and in vivo bioequivalence documentation, 1997b

U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System, 2000

U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for industry: Statistical approaches to establishing bioequivalence, 2001

U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for industry: Food-Effect Bioavailability and Fed Bioequivalence Studies, 2002

U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products – General Considerations, 2003

U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Draft Guidance for Industry, Bioequivalence Recommendations for Specific Products, 2007a

U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Critical Path Opportunities for Generic Drugs, 2007b. Haettu 15.01.2010 internetistä: <http://www.fda.gov/oc/initiatives/criticalpath/reports/generic.html>.

U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Approved Drug Products with Therapeutic Equivalence Evaluations (Orange Book), 30. painos, 2010

Vertzoni M, Dressman J, Butler J, Hempenstall J, Reppas C: Simulation of fasting gastric conditions and its importance for the in vivo dissolution of lipophilic compounds. *Eur J Pharm Biopharm* 60: 413–417, 2005

Vogelpoel H, Welink J, Amidon GL, Junginger HE, Midha KK, Möller H, Olling M, Shah VP, Barends DM: Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms based on biopharmaceutics classification system (BCS) literature data: verapamil hydrochloride, propranolol hydrochloride, and atenolol. *J Pharm Sci* 93: 1945-1956, 2004

Walter-Sack I, de Vries JX, Kriener C, Ittensohn A, Stenzhorn G, Voss A, Weber E: Bioequivalence of allopurinol preparations: to be assessed by the parent drug or active metabolite? *Clin Pharmacol* 71: 240-246, 1993

Welage LS, Kirking DM, Ascione FJ, Gaither CA: Understanding the scientific issues embedded in the generic approval process. *J Am Pharm Assoc* 41: 856-867, 2001

World health organization (WHO), 2006. Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability. Annex 7. WHO technical report series, No. 937

Wonnemann M, Schung B, Schmucker K, Brendel E, van Zwielen PA, Blumel H: Significant food interactions observed with a nifedipine modified-release formulation marketed in the European Union. *Int J Clin Pharmacol Ther* 44: 38-48, 2006

Woodcock J: The concept of pharmaceutical quality. *Am Pharm Rev* 3: 1–3, 2004

Wu C-Y, Benet LZ: Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm Res* 22: 11-22, 2005

Yazdanian M, Briggs K, Jankovsky C, Hawi A: The “high solubility” definition of the current FDA guidance on biopharmaceutical classification system may be too strict for acidic drugs. *Pharm Res* 21: 293-299, 2004

Yu LX, Amidon GL, Polli JE, Zhao H, Mehta MU, Conner DP, Shah VP, Lesko LJ, Chen ML, Lee VHL, Hussain AS: Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. *Pharm Res* 19: 921-925, 2002

CAT-SIMULAATIOMALLINNUS BIOEKVIVALENSSITUTKIMUSTEN
RISKIARVIOSSA

Susanna Heinonen
Pro gradu-tutkielman
kokeellinen osio
Helsingin yliopisto
Farmasian tiedekunta
Biofarmasian osasto

Toukokuu 2010

Sisällysluettelo

1 JOHDANTO	1
2 YLEISTÄ SIMULAATIOMALLINNUKSESTA	2
2.1 Matemaattisen mallinnuksen merkitys lääkekehityksessä	2
2.2 Simulaatiomallinnus lääkekehityksen eri vaiheissa	4
2.3 Simulaatiomallinnuksen kehitys kohti CAT-mallia	5
2.3.1 Dynaamiset mallit	6
3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	9
3.1 Simulaatiomallin rakenne	9
3.1.1 Fysiologiset parametrit	10
3.1.2 Lääkeaineeseen liittyvät parametrit	12
3.1.3 Formulaatiokohtaiset parametrit	14
3.2 BE-riskiarvio ja sen kulku	15
3.2.1 Lääkeaineen taustatiedot	15
3.2.2 Farmakokineettisten parametrien määrittäminen	16
3.2.3 Liuossimuloinnit	17
3.2.4 Liukenemisen nopeusvakioiden määrittäminen	17
3.2.5 Formulaatiosimuloinnit	18
3.2.6 Bioekvivalenssitutkimuksiin liittyvän riskiarvion laatiminen	19
3.3 Tutkittavat lääkeaineet	20
3.3.1 Parasetamoli	21
3.3.2 Alpratsolaami	22
3.3.3 Ibuprofeeni	23
3.3.4 Varfariini	24
4 TULOKSET	26
4.1 Parasetamoli	26
4.1.1 Ka-arvon valinta ja liuossimuloinnit	26
4.1.2 Formulaatiosimuloinnit	27
4.1.3 BE-riskiarvio	28
4.1.4 Simulaatioiden vertailu <i>in vivo</i> BE-tutkimukseen	31
4.2 Alpratsolaami	32
4.2.1 K_a-arvon valinta ja liuossimuloinnit	32
4.2.2 Formulaatiosimuloinnit	33
4.2.3 BE-riskiarvio	33
4.2.4 Simulaatioiden vertailu <i>in vivo</i> BE-tutkimukseen	36
4.3 Ibuprofeeni	37
4.3.1 K_a-arvon valinta ja liuossimuloinnit	37
4.3.2 Formulaatiosimuloinnit	38
4.3.3 BE-riskiarvio	39

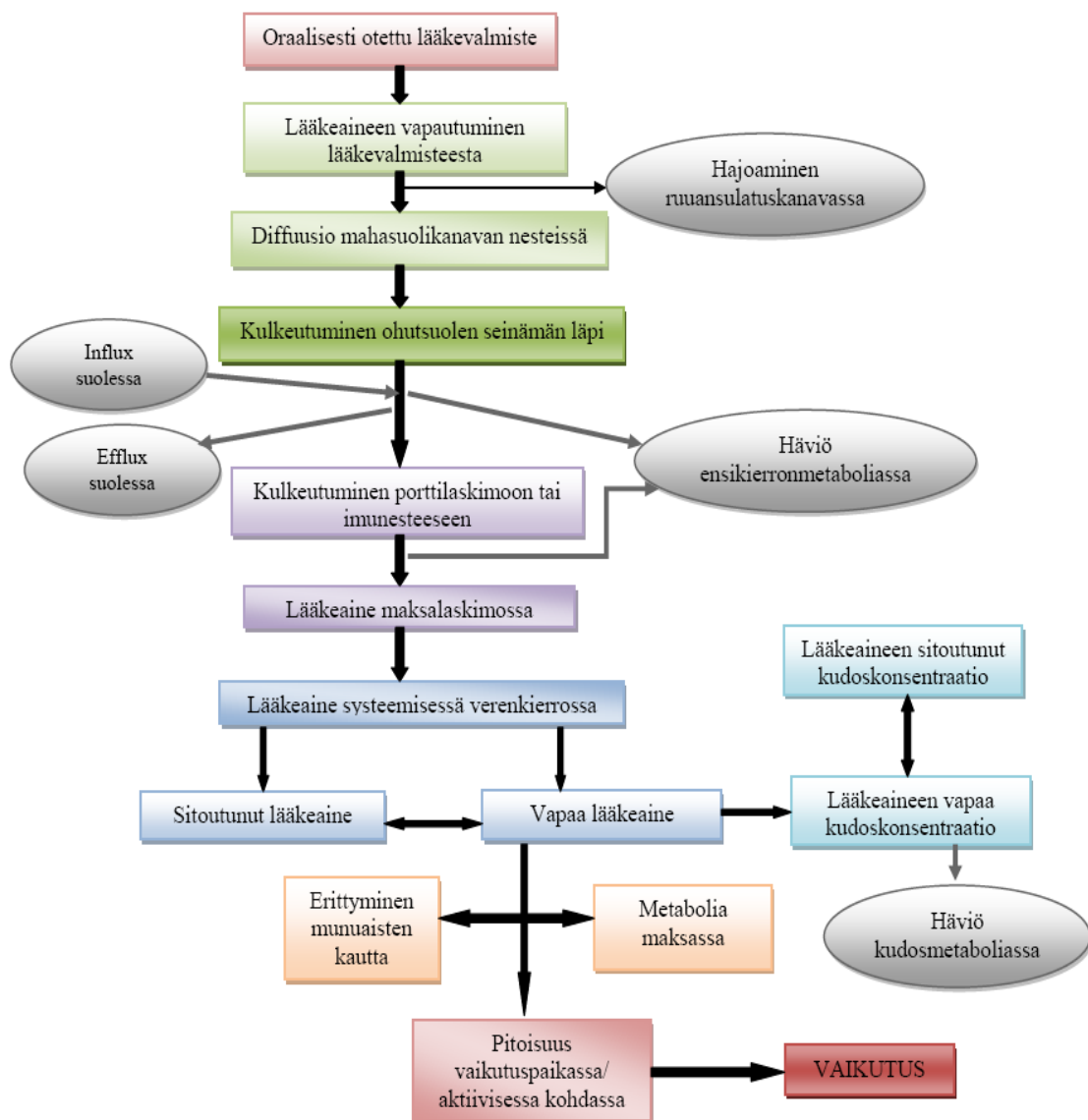
4.3.4 Simulaatioiden vertailu <i>in vivo</i> BE-tutkimukseen.....	42
4.4 Varfariini.....	43
4.4.1 K_a -arvon valinta ja liuossimuloinnit	43
4.4.2 Formulaatiosimuloinnit.....	44
4.4.3 BE-riskiarvio.....	45
4.4.4 Simulaatioiden vertailu <i>in vivo</i> BE-tutkimukseen.....	48
5 POHDINTA.....	50
5.1 Simulaatiomallin ennustuskyvyn arviointi.....	50
5.1.1 Formulaatiokohtaisten tekijöiden vaikutus	50
5.1.2 Mallin oletuksien vaikutus.....	54
5.1.3 Variaation vaikutus	56
5.1.4 Lääkeainekohtaisten tekijöiden vaikutus	57
5.2 Simulaatiomallinnus tulevaisuudessa.....	58
6 YHTEENVETO.....	60
7 LÄHTEET	61

1 JOHDANTO

Lääkeaineen imeytyminen ja kulkeutuminen ihmisen elimistössä on monimutkainen prosessi, johon liittyy useita vaiheita, kuten lääkevalmisteen hajoaminen, ja liukeneminen, lääkeaineen liukeneminen, mahasta tyhjeneminen, ohutsuolessa kulkeutuminen, ohutsuoletta imeytyminen (aktiivinen/passiivinen), sekä metabolia (Kuva 1). Suun kautta annostellun lääkeainemolekyylin imeytyneeseen määrään ja imeytymisnopeuteen vaikuttavat tekijät voidaan karkeasti jakaa kolmeen kategoriaan (Yu ym. 1996a; Martinez ja Amidon 2002): lääkeaineen fysikaalis-kemialliset ja biofarmaseuttiset ominaisuudet, maha-suolikanavan fysiologia, sekä lääkevalmisteesta riippuvaiset tekijät. Ymmärrys siitä, miten edellä mainitut vaiheet ja tekijät yhdessä vaikuttavat lääkeaineen imeytymiseen, on edistänyt lääkkeen imeytymisen ennustamiseen tarkoitettujen mallien kehitystä. Nykyään mallinnusta ja simulaatioita käytetäänkin laajalti lääkkeiden tutkimus- ja kehitystyössä, sekä viranomaissäädösten laatimisessa.

Tämän työn tarkoituksena oli tutkia, miten fysiologiaan perustuvasta imeytymis- ja kulkeutumismallista (CAT, compartmental absorption and transit model) (Yu ym. 1995; 1996a) muokattua farmakokineettistä simulaatiomallia voitaisiin hyödyntää lääkevalmisteiden *in vivo* bioekvivalenssitutkimuksiin (BE-tutkimuksiin) liittyvän riskin arvioinnissa. Työssä tarkasteltiin, millaisille lääkeaineille simulaatiomalli ennustaa BE-tutkimuksen tulosta hyvin ja millaisille heikommin tai huonosti. Samalla pyrittiin arvioimaan, mitä virhelähteitä ja epävarmuustekijöitä CAT-malliin puhjautuviin simulaatiomalleihin sisältyy.

BE-riskiarvion kannalta simulaatioiden tärkein tavoite oli saada formulaatiossa mahdollisesti esiintyvät erot näkymään lääkeaineen ennustetuissa pitoisuus-aikakuvaajissa. Lisäksi pyrittiin arvioimaan, kuinka merkittävää tämä testi- ja referenssivalmisteiden eroavaisuus käytännössä olisi *in vivo* BE-tutkimustuloksien kannalta. Oli myös oleellista kyetä havaitsemaan väärät positiiviset tulokset (simulaatioissa ei nähtävissä eroa valmisteiden välillä, silti riski olemassa) ja syyt niihin.



Kuva 1: Kaavio oralisesti otetun lääkevalmisteen ja lääkeaineen vaikutuksen vuorovaikutussuhteista ja lääkeaineen imeytymisprosessiin vaikuttavista tekijöistä.

2 YLEISTÄ SIMULAATIOMALLINNUKSESTA

2.1 Matemaattisen mallinnuksen merkitys lääkekehityksessä

Lääkekehitysprojekti molekyylistä myyntilupaun kestää 10–12 vuotta ja maksaa kokonaisuudessaan keskimäärin 900 miljoonaa euroa (Lääkätietokeskus 2009; Rick 2005). Karsinta on kovaa, sillä ainoastaan murto-osa prekliinisen vaiheen lääkeaihoista etenee kliinisen vaiheen tutkimukseen ja näistä noin yksi saa myyntiluvan. Myyntiluvan

saaneista lääkkeitäkin vain osa tuo kehityskustannukset takaisin ja vielä harvempi voittoa.

Lääkekehityksen mittavat kustannukset ja kilpailu lääkemarkkinoilla näkyvät myös siinä, että geneeriset vaihtoehdot alkuperäisvalmisteille ovat vähitellen kasvaneet maailmanlaajuisesti lääkemarkkinoita hallitseviksi. Esimerkiksi Yhdysvalloissa geneeristen lääkkeiden valmistajat ovat haalineet 70 prosentin osuuden reseptilääkkeiden markkinoilla (Helsingin Sanomat joulukuussa 2009). Rinnakkaisvalmisteiden myynnin kasvu on voimistunut erityisesti siksi, että lääkeshoidosta aiheutuvaa yhteiskunnallisten kustannusten kasvua on yritetty hillitä maailmalla eri keinoin.

Kaikesta päätellen lääketeollisuuden yhdeksi suurimmista haasteista onkin syntynyt tarve välttää ajan ja resurssien hukkaamista epäonnistuneisiin hankkeisiin, niin uusien, kuin geneeristenkin lääkevalmisteiden osalta. Tästä syystä lääkeaineiden ja lääkevalmisteiden käyttäytymistä elimistössä pyritään ennustamaan erilaisen mallinnusmenetelmien avulla mahdollisimman hyvin jo varhaisessa vaiheessa lääkekehityskaarta, ennen kalliita *in vivo* tutkimuksia ihmisillä. Viime vuosina erilaisten kokeellisten *in situ*, *in vivo* ja *in vitro* mallinnusmenetelmien rinnalle entistä merkittävämpään rooliin ovat nousseet erilaiset laskennalliset *in silico* menetelmät. Matemaattisten mallien etuna on niiden edullisuus, eivätkä ne ole yhtä työläitä ja aikaa vieviä, kuten mm. *in vivo* eläinkokeet ja *in vitro* epiteelisoluviljelymallit. Useimmissa tapauksissa matemaattisiin malleihin ei myöskään liity eettisiä kysymyksiä, kuten eläinkokeisiin.

Kaike kaikkiaan farmakokineettisten simulaatiomallien laaja käyttö alkaen mahdollisimman varhaisesta vaiheesta lääkekehityskaarta aina kliniseen vaiheeseen saakka parantaisi lääkevalmisteiden farmaseuttista ja biofarmaseuttista laatua, sekä vähentäisi lääkkeen kehitykseen kuluva-aikaa ja resursseja. Tulevaisuuden tavoitteena on, että yhä useammassa tapauksessa matemaattisilla tietokonemalleilla voitaisiin korvata selvästi hitaammat biologiset tutkimusmenetelmät (mm. *in vitro*, *in vivo*).

2.2 Simulaatiomallinnus lääkekehityksen eri vaiheissa

Seuraavassa esitellään Hanna Kortejärven väitöskirjaa mukaillen, kuinka simulaatiomalleja voidaan parhaimmalla tavalla hyödyntää lääkekehityskaaren eri vaiheissa (Kortejärvi 2008).

Keksimisvaiheessa (discovery phase) tunnetaan tutkittavan lääkeaineen kolme keskeisintä *in vitro*-parametria, eli permeabiliteetti, liukoisuus ja liukeneminen. Näiden tietojen avulla voidaan suorittaa simulaatioita mm. lääkeaineen BCS-luokan ja korkeimman imeytyvän lääkeannoksen määrittämiseksi, jolloin saadaan suuntaa antavaa tietoa lääkeaineen imeytymisen määrästä ja imeytymisen nopeutta rajoittavista tekijöistä. Tätä tarkemmat arviot edellyttäisivät kuitenkin Kortejärven mukaan dynaamisten farmakokineettisten simulaatiomallien (esim. CAT-malli) käyttöä. Esimerkiksi *in vivo* imeytymisen kuvaajat voidaan simuloida, kun permeabiliteetti-, liukoisuus- ja liukenemisparametrit yhdistetään tunnettujen mahasuolikanavan ominaisuuksien kanssa. *In vivo* imeytymisen kuvaajien avulla voidaan edelleen arvioida lääkeaineen imeytymiseen vaikuttavia kriittisimpiä tekijöitä ja erityyppisiä formulaatiostrategioita, kuten tarvitaanko lääkevalmisteessa liukenemista, liukoisuutta tai permeabiliteettia parantavia apuaineita.

Non-kliinisessä tutkimusvaiheessa on saatavilla farmakokineettistä aineistoa eri koe-eläinlajeista. Tällöin, permeabiliteetin, liukoisuuden ja liukenemisen parametrit voidaan yhdistää tietyn koe-eläinlajin mahasuolikanavan ominaisuuksien kanssa. Tässä vaiheessa on saatavilla myös farmakokineettistä aineistoa lääkeaineen jakautumisesta ja eliminaatiosta, jolloin on mahdollista ennustaa konsentraatioprofiileja yhdistämällä CAT-malli farmakokineettisiin tilamalleihin (Kortejärvi 2008; Yu ym. 1996a). Ennustettuja ja kokeellisesti määritettyjä imeytymis- tai konsentraatioprofiileja voidaan vertailla keskenään ja määrittää mahdollisesti myös skaalauskerroimia *in vitro* ja *in vivo* aineiton välille. Kortejärvi painottaa, että farmakokineettisen mallin tulisi kyetä ensin ennustamaan lääkeaineen käyttäytymistä jossakin koe-eläinlajissa, jotta saataisiin simulaatiot ihmisessä mahdollisimman luotettaviksi. Hän kuitenkin huomauttaa, että maha-suolikanavan fysiologiassa on konkreettisia eroja eläinten ja ihmisten välillä ja lisäksi transporttereiden ja metaboliaentsyymien määrät voivat vaihdella. Tästä syystä

non-kliinisen aineiston perusteella ei voida tehdä kvantitatiivisia ennusteita lääkeaineen imeytymiskäyttäytymisestä ihmisessä. Sen sijaan sen imeytymiseen vaikuttavia kriittisiä tekijöitä, kuten alhainen liukoisuus ja liukeneminen tai alhainen permeabiliteetti, voidaan arvioida.

Kliinisessä tutkimusvaiheessa CAT-malli päivitetään ihmisestä peräisin olevalla farmakokineettisellä aineistolla. Tällöin simuloituja ja kokeellisia imeytymis- ja konsentraatioprofiileja ihmisessä voidaan vertailla keskenään. Kortejärven mukaan se, miten CAT-mallia voidaan hyödyntää, riippuu lääkeaineen/valmisteiden ominaisuuksista, sekä *in vitro* ja *in vivo* aineiston laadusta. Kaikkein parhaimmassa tapauksessa, lääkeaineen plasman konsentraatiokuvaajat voidaan ennustaa pohjautuen *in vitro* parametreihin, jotka kuvaavat lääkeaineen imeytymisvaihetta ja *in vivo* parametreihin, jotka puolestaan kuvaavat jakautumis- ja eliminaatiovaihetta.

Geneeristen lääkevalmisteiden kohdalla on erityisen merkittävää, miten lääkevalmiste käyttäytyy elimistössä, sillä imeytymisnopeuden ja imeytyneen lääkeainemäärän on oltava ennalta asetettujen rajojen (0.8-1.25 90 % luottamusvälillä, ANOVA) puitteissa samankaltaiset alkuperäisvalmisteiden (referenssivalmisteiden) kanssa (Lionberger 2008). Näin ollen geneeristen lääkevalmisteiden kehityksessä on ymmärrettävä, mitkä tekijät formulaatiossa ja valmistustekniikassa vaikuttavat merkittävästi tietyn aktiivisen lääkeaineen vapautumiseen valmisteesta ja edelleen sen imeytymiseen.

Simulaatiomalleja voitaisiin käyttää mm. arvioimaan/ennustamaan lääkevalmisteiden *in vivo* liukenemista tai lääkeaineen vapautumisnopeuden yhteyttä parametreihin, jotka kuvaavat bioekvivalenssia (C_{max} ja AUC). Tämä edesauttaisi ymmärtämään, minkälainen lääkeaineen vapautumiskuvaajat testivalmisteissa on oltava bioekvivalenssin saavuttamiseksi (Lionberger 2008). Tämän jälkeen tulisi valita sellaiset apuaineet, sekä suunnitella formulaatio ja vapautumismekanismi, mitkä mahdollistaisivat ko. *in vivo* vapautumiskuvaajan aikaansaamisen.

2.3 Simulaatiomallinnuksen kehitys kohti CAT-mallia

Lähes vuosisadan ajan on yritetty kehittää teoreettista mallia, jolla tehtyjä simulaatioita voitaisiin rinnastaa jopa suoraan tilanteeseen ihmisissä ja ennustaa mahdollisimman tarkasti oraalisesti otetun lääkeaineen imeytymistä. Useita kvantitatiivisia ja kvalitatiivisia lähestymistapoja on ehdotettu, muokattu ja jatkokehitetty. Katselmusartikkelissaan Yu kumppaneineen (Yu ym. 1996 a) jakoi nämä erilaiset, kirjallisuudessa esitetyt, laskennalliset mallit kolmeen kategoriaan sen perusteella, millä tavoin ne ovat riippuvaisia tilan ja ajan muuttujista; näennäisen tasapainotilan mallit (Jacobs 1940, Hogben ym. 1959, Schanker 1960; Dressman ym. 1985), vakaantilan mallit (Amidon ym. 1988; Sinko ym. 1991) ja dynaamiset mallit. Lajittelu auttaa havaitsemaan ja ymmärtämään eroavaisuudet mallien välillä. Karkeasti yleistäen, niiden monimutkaisuus lisääntyy siirryttäessä näennäisen tasapainotilan malleista aina dynaamisiin malleihin. Seuraavassa esitellään tärkeimmin dynaamisia malleja, joista myös erikoistyössä käytetty CAT-malli on kehittynyt.

2.3.1 Dynaamiset mallit

Dynaamiset mallit huomioivat, sekä ajan, että tilan muuttujat (Yu ym. 1996 a). Niiden avulla voidaan ennustaa, sekä lääkeaineen imeytymisen nopeutta, että imeytynttä määrää.

Dispersiomalli edusti ensimmäistä sovellusta fysiologiaan pohjautuvasta simulaatiosta, jonka avulla voitiin tutkia samanaikaisesti lääkkeen imeytymistä ja kulkeutumista suolessa (Ni ym. 1980; Suzuki ym. 1970 I/II; Ho ym. 1972). Sen tarkoituksena oli arvioida kvantitatiivisesti ja mekanistisesti lääkeaineen *in vivo* imeytymistä (Ho ja Higuchi 1971; Ni ym. 1980). Dispersiomallissa oletetaan esim. ohutsuolen olevan yhtenäinen putki, jossa on muuttumaton pitkittäissuuntainen nopeus ja sekoittumiskäyttäytyminen, sekä vakio konsentraatio läpi putken halkaisijan (Yu ym. 1996a). Putkessa on tilan mukaan vaihtelevia parametreja (esim. pH, pinta-ala). Monimutkaisuutensa takia tämä kulkeutumismalli ei ole koskaan ollut laajalti käytössä.

Myöhemmin kehitettiin edelliseen verrattuna yksinkertaisempi menettelytapa, jossa GI-kanava ajatellaan yhdeksi tai useammaksi, sarjaan asetetuksi, sekoitussäiliöksi (the mixing tank model), joista on lineaarinen kulkeutumiskinetiikka seuraavaan (Goodacre ja Murry 1981; Ho ym. 1983a; Dressman ym. 1984). Säiliöt ovat hyvin sekoittuvia ja niissä on sama lääkepitoisuus. Sekoitussäiliö-mallin simulaatioissa voidaan hyödyntää tutkittavalle lääkeaineelle kokeellisesti mitattuja parametreja, ja yhdistää ne fysiologisiin parametreihin (Dressman ym. 1984; Dressman ja Fleisher 1986), jolloin mallia pystytään muokkaamaan lääkeaineen mukaan. Sekoitus-säiliö-malli (Ho ym. 1983b) koettiin tutkijoiden keskuudessa käyttökelpoiseksi simulointi keinoksi, mutta se ei ollut fysiologisesti täysin pätevä. Muun muassa säiliöiden lukumäärän havaittiin vaikuttavan simulaation tuloksiin ratkaisevasti, mutta ei ollut täyttä selvyyttä, kuinka montaa säiliötä simuloinnissa tulisi käyttää.

Jotta maha-suolikanavaa voitiin kuvata malleissa fysiologisesti oikein, tarvittiin analyysi siitä, miten kulkeutumisaika jakautuu ohutsuolessa, ja mikä oli ohutsuolen yksiköiden oikea määrä. Tunnettiin, että ohutsuolen kulkeutumisaika terveillä vapaaehtoisilla on riippumaton lääkemuodosta, tutkittavan henkilön sukupuolesta, iästä, painosta ja nautitusta ravinnosta (Davis ym. 1986; Madsen 1992). Tähän tietoon perustuen Yu työtovereineen keräsi yli 400:sta eri kirjallisuuslähteestä aineistoa ihmisen ohutsuolen kulkeutumisajoista erilaisille annosmuodoille ja kokosi ne yhtenäiseksi tiedostoksi (Yu ym. 1996a). Aineiston pohjalta tehty statistinen analyysi paljasti, että ohutsuolen kulkeutumisaika noudattaa logaritmista normaalijakaumaa, ja on keskimäärin 3.3 tuntia (Yu ym. 1996a/b; Yu ja Amidon 1998a). Lisäanalyysien perusteella seitsemän saman kulkeutumisajan omaavaa yksikköä antoi parhaimman sovituksen tehtäessä vertailuja kokeellisesti havaittuihin arvoihin (Yu ym. 1996b; Yu ja Amidon 1998a). Tämä ohutsuolen 7-yksikön kulkeutumismalli voidaan fysiologisesti havainnollistaa siten, että ensimmäisen yksikön ensimmäinen puolikas kuvastaa duodenumia, toinen puolikas ensimmäisestä yksiköstä, sekä 2. ja 3. yksikkö jejunumia, ja loput ileumia (Yu ym. 1996b). Vastaavat kulkeutumisajat duodenumissa, jejunumissa ja ileumissa ovat 14, 71, ja 114 minuuttia.

Kulkeutumistutkimuksiinsa pohjaten, Yu kumppaneineen kehitti fysiologiaan perustuvan imeytymis- ja kulkeutumismallin, CAT, jolla kyettiin simuloimaan liuoksessa olevan lääkeaineen määrän kulkeutumisvirtausta GI-kanavassa, sekä arvioimaan samanaikaisesti sen imeytymisen nopeutta ja kumulatiivisesti imeytynyttä määrää (Yu ym. 1995; 1996a/b). CAT-mallia kuvataan differentiaaliyhtälöiden joukolla, jotka huomioivat yhtä aikaa lääkeaineen kulkeutumisen segmenttien läpi ja edelleen liuenneen materiaalin imeytymisen jokaisesta ohutsuolen yksiköstä porttilaskimoon.

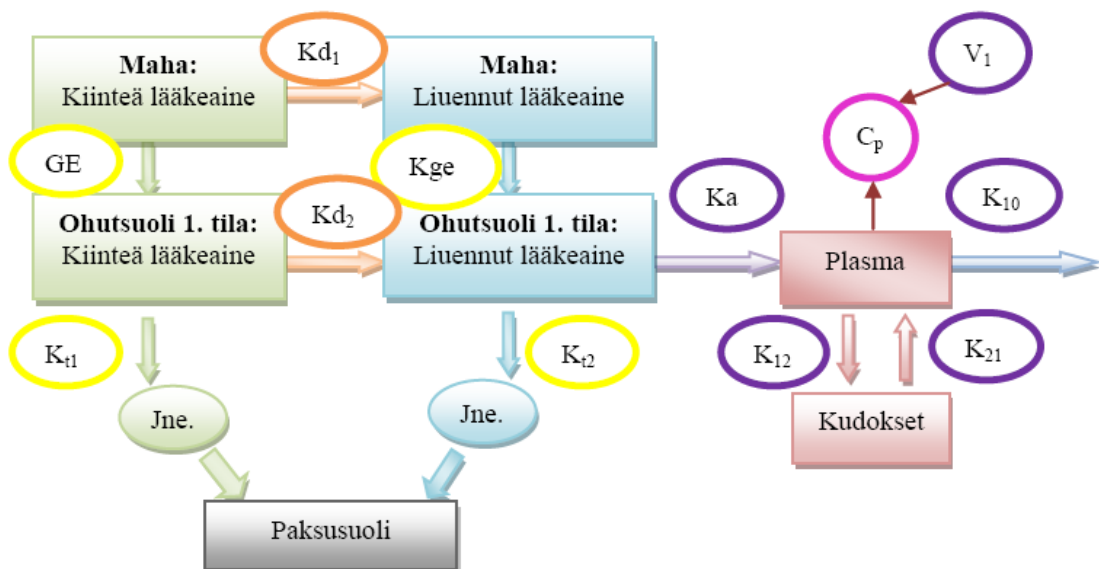
CAT-malli oli alun perin tarkoitettu passiivisesti solukalvon läpäiseville, hyvin liukeneville lääkeaineille, joilla ei esiinny hajoamista GI-kanavassa (Yu ym. 1996a). Mallilla tutkittavien lääkevalmisteiden tuli olla välittömästi mahassa lääkeaineen vapauttavia (IR) formulaatioita (Yu ym. 1996a). Myöhemmin CAT-mallia on kuitenkin hyödynnetty myös tutkimuksissa, joissa lääkeaineilla esiintyi useita eri imeytymismekanismia (Yu ym. 1999). Sitä on laajennettu ennustamaan myös annosriippuvaista lääkkeen imeytymistä, johon liittyy lääkeaineen hajoaminen ohutsuolessa (Yu ja Amidon 1998b). Lisäksi sitä on jatkokehitetty arvioimaan säädellysti lääkeainetta vapauttavien lääkevalmisteiden (CR-valmiste) lääkannoksesta imeytynyttä osuutta lisäämällä malliin segmentti, joka kuvaa lääkeaineen vapautumista (Yu ym. 1996a).

Huomioimalla mahan tyhjeneminen ja lääkevalmisteen liukeneminen, CAT-mallilla on voitu ennustaa myös lääkannoksesta imeytynyttä osuutta huonosti imeytyville lääkeaineille, kuten digoksiinille, ja toisaalta selvittää syitä huonon imeytymisen takana (liukenemis-, liukoisuus- tai permeaatorajoitteinen imeytyminen) (Yu 1999). Kortejärvi kumppaneineen kehitti myöhemmin vastaavanlaisen, CAT-malliin pohjautuvan, lähestymistavan ottamalla samanaikaisesti huomioon mahan tyhjenemisen, lääkevalmisteen liukeneminen, ja lääkeaineen kulkeutumisen GI-kanavassa (Kortejärvi ym. 2007). Kyseillä mallilla tutkittiin erilaisten tekijöiden (mm. formulaatiotyypin, GI-kanavan fysiologian, liukenemisen, imeytymisen ja eliminaation) vaikutusta biowaiver-kriteerien arviointiin (Kortejärvi ym. 2007).

3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

3.1 Simulaatiomallin rakenne

Simulointimallien pohjana käytettiin edellä kuvattua, Yu:n työtovereineen kehittämää, imeytymis- ja kulkeutumismallia, CAT-mallia (Yu ym. 1995; 1996a/b). Alkuperäistä CAT-mallia muokattiin huomioimaan lääkeformulaatioon, ja lääkeaineen ominaisuuksiin liittyviä parametreja, sekä kirjallisuudessa tunnettuja muuttujia suoliston anatomiassa ja fysiologiassa (kuva 2). Kyseiset muuttujat olivat osittain samankaltaisia, kuin Kortejärven tutkimuksessa käytetyt (Kortejärvi ym. 2007). Mallissa huomioitiin myös lääkeannoksen koko.



Kuva 2: Cat-mallin rakenne ja mallissa käytetyt parametrit kiinteälle ja liuoksessa olevalle lääkeaineelle (fysiologiset parametrit keltaisella, lääkeainekohtaiset violetilla ja formulaatiokohtaiset oranssilla): **GE** on mahan tyhjeneminen kiinteille lääkevalmisteille, **K_{ge}** on mahan tyhjenemisen nopeusvakio liuenneelle lääkeaineelle, **K_{d1}** on liukenemisen nopeusvakio mahassa, **K_{d2}** on liukenemisen nopeusvakio suolessa, **K_{t1} ja K_{t2}** ovat suolessa kulkeutumisen nopeusvakiot sekä kiinteälle, että liuokselle (samansuuruiset), **K_a** on imeytymisen nopeusvakio, **K_{10}** on eliminaation nopeusvakio ja **K_{12} sekä K_{21}** ovat jakautumisen nopeusvakiot. **C_p** on lääkeaineen pitoisuus plasmassa ja **V_1** on IV-aineistosta laskettu jakautumistilavuus.

Simulaatiomallissa GI-kanava koostui yhdeksästä osasta. Mahaa ja paksusuolta käsiteltiin yksittäisinä segmentteinä, mutta ohutsuoli jaettiin edelleen seitsemään

sarjassa olevaan yksikköön (Yu ym. 1996a/b, Yu ja Amidon 1999). Kaikki työssä tutkitut lääkevalmisteet olivat nopeasti lääkeaineen vapauttavia IR-formulaatioita.

Mallissa lääkeainetta liukeni, sekä mahassa, että ohutsuolessa. Kiinteä ja liuennut lääkeaine tyhjenivät mahasta ohutsuoleen, minkä jälkeen niillä oli samankaltainen jakautumis- ja kulkeutumiskinetiikka yksiköstä toiseen (Yu ym. 1996b). Ainoastaan liuennut lääkeaine imeytyi ja imeytymistä tapahtui vain ohutsuolessa, samalla 1. kertaluvun nopeusvakiolla jokaisesta ohutsuolen yksiköstä (Yu ym. 1996b).

Mallin rakentamisessa käytettiin STELLA® (Structural Thinking Experimental Learning Laboratory with Animation) (isee systems, Lebanon, USA) tietokoneohjelma sovellusta. Mallia rakennettaessa aineisto voidaan syöttää suoraan numeerisesti tai kaavan muodossa. Ohjelma vaatii tietämystä tekijöistä, jotka kontrolloivat massan kulkeutumisenopeutta tilasta toiseen.

3.1.1 Fysiologiset parametrit

Tutkimusta varten kirjallisuudesta etsittiin tarkempaa tietoa erilaisten valmistemuotojen (oraalinen liuos, moni-yksikkövalmiste ja yksi-yksikkövalmiste) kulkeutumisen kinetiikasta GI-kanavassa ja mahan tyhjenemisajoista. Näitä tekijöitä on tutkittu erilaisilla kuvantamismenetelmillä, kuten gamma- eli isotooppikuvauksella. Vastatakseen bioekvivalenssitutkimusten olosuhteita simulaatiomalliin syötettiin ainoastaan parametreja, jotka oli määritetty paastossa (EMEA BE-ohjeisto 2010).

Kuten aikaisemmin mainittiin, lääkevalmisteen keskimääräinen kulkeutumisaika koko ohutsuolen läpi on 3.3 tuntia formulaatiotyypistä riippumatta, ja lisäksi kulkeutuminen noudattaa 1. kertalukua (Yu ym. 1996b; Wilding ym. 2003; Hellström ym. 2006). Koska ohutsuoli koostui mallissa 7 yksiköstä, simulaatioissa käytettiin ohutsuolessa kulkeutumisen nopeusvakiona (K_{t1} kiinteälle ja K_{t2} nesteelle) arvoa 2.1 h^{-1} .

Erilaisten lääkevalmisteiden mahasta tyhjeneminen ei sen sijaan ole yhdenmukaista (Wilding ym. 2003; Hellström ym. 2006; Davis ym. 1986). Ensinnäkin nautitut nesteet jakautuvat nopeasti koko mahan alueelle ja kalorittomien nesteiden tyhjentymisen

mahasta alkaa välittömästi (Hellström ym. 2006). Mahan tyhjenemisen kinetiikka liuoksille noudattaa 1. kertalukua (Meyer 1987; Wilding ym. 2003). Mahan tyhjenemisen nopeusvakion arvona oraaliselle liuokselle (K_{ge}) käytettiin 3.5 h^{-1} . Kyseinen arvo laskettiin kirjallisuudesta saadusta liuokselle määritetystä mahan tyhjenemisen puoliintumisajasta, jonka on tutkittu olevan noin 12–20 minuuttia (Hellström ym. 2006; Oberle ym. 1990). Laskuissa käytettiin 12 minuuttia, koska K_{ge} arvoa oli hyödynnetty myös Kortejärven simulaatiomalli tutkimuksessa (Kortejärvi ym. 2007).

Mahan tyhjeneminen (GE) yksi-yksikkövalmisteelle (SU) (yhdelta kiinteälle yksikölle) tapahtuu nopeana boluksena (Wilding ym. 2003; Cora` ym. 2006), eli koko mahan sisältö tyhjenee, kun mahan puhdistusaalto tapahtuu noin joka 1.3-2 tunnin välein (Wilson ja Washington, 1989). Tällöin mahanportti aukeaa ja kiinteät partikkelit kulkeutuvat ohutsuoleen. Puhdistusaallon ajankohta on yksilöllistä, joten SU-valmisteiden mahan tyhjenemisnopeuteen liittyy variaatiota. Simulaatiotutkimuksissa yksi-yksikkövalmisteet määritettiin tyhjentymään mahasta, siten, että ennen kuin aikaa oli kulunut 0.75 h, lääkettä ei tyhjentynyt mahasta lainkaan, sen jälkeen koko annos tyhjeni mahasta kerralla. Tämä ajankohta oli keskiarvo kahden kirjallisuudessa etsityn tutkimuksen yksittäisistä mahan tyhjenemisajankohdan arvoista SU-valmisteelle (Wilding ym. 2003 ja Cora` ym. 2006).

Mahan tyhjeneminen moni-yksikkövalmisteelle (MU) noudattaa 0. kertaluvun kinetiikkaa (Wilding ym. 2003 ja Christensen ym. 1985). MU-valmisteiden simuloinneissa käytettiin kirjallisuudessa määritettyä tietoa siitä, että 51 % alkuperäisestä annoksesta tyhjenee mahasta ohutsuoleen 1 tunnissa (Wilding ym. 2003 ja Kortejärvi ym. 2007). Niiden kohdalla on myös huomioitava, että halkaisijaltaan alle 2mm olevat pelletit, läpäisevät aina hieman raollaan olevan mahaportin nesteen tavoin, eli välittömästi, ilman mahan tyhjenemisaallon vaikutusta (Hofmann ym. 1983; Kelly 1981).

Nesteen tilavuus määritettiin nimuloinneissa samoin kuin Kortejärven kumppaneineen 2007 tekemässä tutkimuksessa, eli nesteen tilavuus mahassa laskee asteittain ajan

kuluessa 250 ml:sta 50ml:iin. Tavallisesti mahassa on paastossa 50 ml nestettä (Wilson ja Washington 1989; Schiller ym. 2005), ja kun lääke otetaan veden kanssa (BE-kokeissa tyypillisesti 200ml vettä), niin tilavuus mahassa kasvaa 250 ml, mistä se jälleen laskee alkuperäiseen 50 ml:iin. Nesteen tyhjenemisnopeus mahasta määritettiin samalla nopeusvakion arvolla, kuin oraaliselle liuokselle (3.5 h^{-1}). Ohutsuolen nesteen kokonaistilavuus on esitetty olevan noin 250 ml (Amidon ym., 1995), jolloin simulaatiomallissa tilavuus jokaisessa ohutsuolen yksikössä oli 35.7 ml.

3.1.2 Lääkeaineeseen liittyvät parametrit

Tähän kategoriaan kuuluvat parametrit ovat lääkeainekohtaisia, joten niitä vaihdettiin simulaatiossa tutkittavan lääkeaineen mukaan.

Tutkituille lääkeaineille etsittiin kirjallisuudesta ja Orionin kokeellisista liukoisuustutkimustuloksista niiden saturaatioliukoisuuden arvot fysiologisesti relevanteissa pH:issa, eli pH 1.2 (maha) ja pH 6.8 (suoli).

Lääkeaineen imeytymisnopeuden oletettiin noudattavan ensimmäistä kertalukua (Yu ym. 1996b). Sen kuvaamiseen tarvittiin imeytymisen nopeusvakiota (K_a), jonka määrittämiseen käytettiin ensisijaisesti kirjallisuudessa esitettyä kaavaa (Kaava 1, Linnankoski ym. 2006), ellei ollut muita perusteluja. Muussa tapauksessa K_a otettiin kirjallisuudesta *in vivo* liuosaineistosta. K_a -arvo on imeytymisen nopeusvakio, sille lääkeaineosuudelle, joka pääsee muuttumattomana systeemiseen verenkiertoon.

Kaava 1. Imeytymisen nopeusvakiota (K_a) kuvaava kaava (Linnankoski ym. 2006).

$$\log K_a = 0.623 + 0.154 \times \log_{D6.0} - 0.007 \times \text{PSA}$$

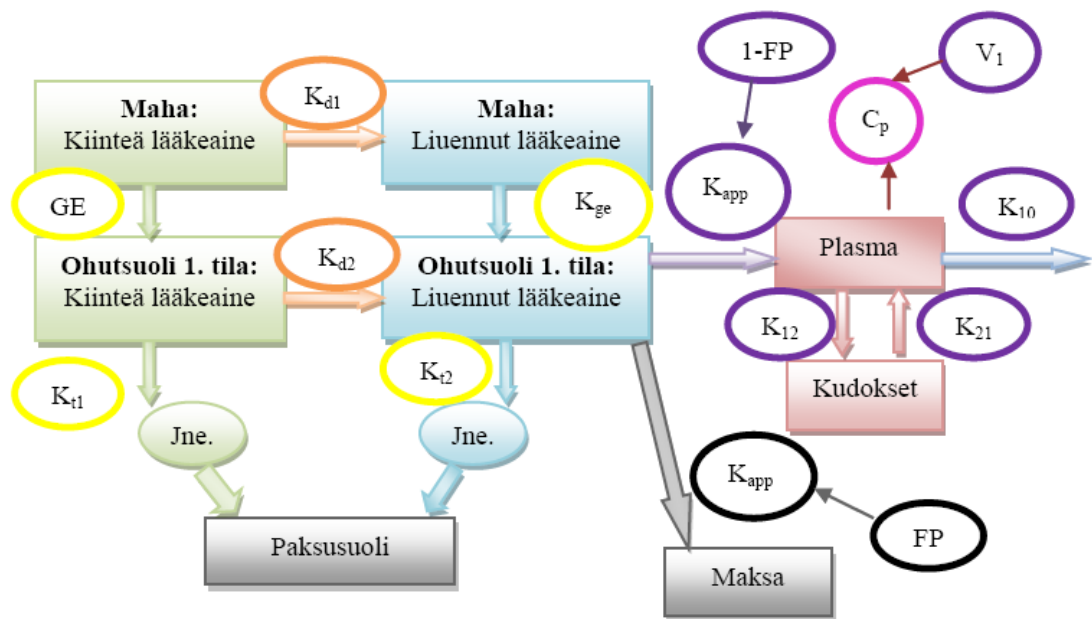
, jossa K_a = imeytymisen nopeusvakio, $\log_{D6.0}$ = lääkeaineen oktanoli-vesi jakatuminen fysiologisesti relevantissa pH:ssa (pH 6) ja PSA = lääkeaineen polaarinen pinta-ala.

Kaavan 1 ratkaisussa tarvittavat lääkeaineen $\log_{D6.0}$ ja PSA arvot laskettiin kullekin lääkeaineelle Orionilla. $\log_{D6.0}$ -arvot laskettiin ACD/Labs ohjelman versiolla 11.0, ja PSA versiolla 6.0. Laskennassa käytettiin lääkeaineiden topologisia (2D) rakenteita.

Jos lääkeaineella ei esiintynyt ensikierronmetabolialla, ja käytettiin kirjallisuusarvoja, K_a saatiin kertomalla näennäinen imeytymisen nopeusvakio (K_{app}) lääkeaineen biologisella hyötyosuudella (BA). K_{app} -arvolla kuvataan kokonaisuudessaan sitä lääkeaineosuutta, jolla on mahdollisuus imeytää (vapautunut lääkevalmisteesta ja liennut), eikä siinä näin ollen huomioda imeytymispaikalta poistuvaa, luumenissa hajoavaa tai ensikierronmetabolian takia häviävää lääkeaineosuutta. Työssä oletettiin, että lääkeaineen, jolla ei esiinny ensikierronmetabolialla, biologisen hyötyosuuden voitiin katsoa tarkoittavan lääkeaineannoksesta imeytynyttä osuutta (FA, fraction absorbed in humans). Lisäksi, jos lääkeaineen biologinen hyötyosuus oli suuri, K_a -arvo oli käytännössä samansuuruinen, kuin K_{app} -arvo. Lääkeaineiden biologinen hyötyosuus etsittiin kirjallisuudesta.

Jos lääkeaineelle löytyi kirjallisuudesta mainintoja ensikierronmetaboliasta, käytettiin mallia ("maksalaatikkomalli"), jossa maksa esitettiin omana segmenttinään ja lääkeainetta imeytyi jokaisesta ohutsuolen yksiköstä sekä plasmahan, että maksaan (ensikierronmetabolialla) (kuva 3). K_a -arvo määritettiin eri tavoin maksaan ja plasmahan menevälle osalle. Kertomalla K_{app} ensikierronmetabolian osuudella (FP, first pass), saatiin ensikierronmetabolian imeytymisen nopeusvakio, ja kun se kerrottiin 1-FP, saatiin varsinainen lääkeaineen imeytymisen nopeusvakio. Toisin sanoen 1-FP oli lääkeannoksesta systeemiseen verenkiertoon päässyt lääkeaineen osuus. Näitä simulaatioita varten oli erityisen oleellista etsiä kirjallisuudesta (tai laskea) nimenomaan näennäinen imeytymisen nopeusvakio (K_{app}).

Jotta lääkeaineen jakautumista ja eliminaatiota plasmasta voitiin kuvata, ja jotta simulaatioista saatiin tulokseksi lääkeaineen pitoisuus-aikakuvaajat, CAT-malliin liitettiin farmakokineettinen tilamalli (kuva 2 ja 3) (Yu ym. 1996a). Sopiva tilamalli vallittiin tutkittavan lääkeaineen farmakokineettisten ominaisuuksien mukaan (kuvataan tarkemmin kappaleessa 3.2.3). Lääkeaineen jakautumisen ja eliminaation oletettiin noudattavan 1. kertalukua.



Kuva 3: ”Maksalaatikko”-mallin rakenne ja mallissa käytetyt parametrit ovat muuten samoja kuin kuvassa 2 esitetystä perinteisestä mallista, mutta: K_{app} on näennäinen imeytymisen nopeusvakio, FP on ensikierronmetabolia (first-pass).

3.1.3 Formulaatiokohtaiset parametrit

Simulaatioissa formulaatiokohtaiset parametrit koskivat lääkeaineen liukenemista lääkevalmisteesta mahassa ja jokaisessa ohutsuolen yksikössä. Lisäksi mahan tyhjeneminen määräytyi valmistetyypin (MU/SU) mukaan (kuvattiin aikaisemmin kappaleessa 3.1.1).

Liukenemisnopeus määritettiin simulaatiomalliin yhtälön avulla (kaava 2). Liukenemisen nopeusvakiot (K_d) määritettiin (kuvataan tarkemmin kappaleessa 3.2.5) kunkin lääkeaineen testi ja referenssi formulaation kokeellisesta *in vitro* liukenemisen aineistosta (Orionilta).

Kaava 2. Liukenemisnopeuden kaava

$$\frac{dM}{dt} = K_d \times \frac{C_s - C_t}{C_s} \times AS$$

, jossa $\frac{dM}{dt}$ = liukenemisnopeus, K_d = Liukenemisen nopeusvakio, C_s = Lääkeaineelle ominainen (saturaatio)liukoisuus, C_t = Liuenneen lääkeaineen pitoisuus, AS = Ajasta riippuvainen parametri, joka kuvaa kiinteän lääkeaineen määrää mahassa ja kussakin ohutsuolen yksikössä.

3.2 BE-riskiarvio ja sen kulku

Simulaatioihin perustuvan riskiarvion laatimisessa edettiin vaiheittain (kaavio 1). Jokainen vaihe täydensi simulaatiomallia ja vaikutti siitä saatavien tulosten luotattavuuteen ja ennustuskykyyn. Seuraavassa kaavion 1 työvaiheita on esitelty tarkemmin.

3.2.1 Lääkeaineen taustatiedot

Lääkeaineen fysikaaliskemiallisista ominaisuuksista, kuten PSA, $\log D_6$, $\log P$, molekyylipaino, happo/emäsluonne, liukoisuus, pKa etsittiin tietoa kirjallisuudesta. Lisäksi selvitettiin lääkeaineen farmakokinetiikan ominaispiirteitä (PK) (esim. PK lineaarisuus, metabolia ja ensikierronmetabolia, lääkeaineen sitoutuminen plasman proteiineihin, biologinen hyötyosuus). Käytännössä, selvitettiin tekijöitä, jotka saattaisivat vaikuttaa lääkeaineen imeytymisnopeuteen ja imeytyneeseen määrään.

CAT-mallissa tarvittavien farmakokineettisten parametrien määrittämistä varten kirjallisuudesta etsittiin tutkittaville lääkeaineille aineistoa laskimonsisäisestä lääkkeenannosta (IV) (*in vivo*).

Kaavio 1: Työvaiheet bioekvivalenssitutkimuksiin liittyvän riskiarvion tekemiseen.



3.2.2 Farmakokineettisten parametrien määrittäminen

Lääkeaineen IV-aineistoon pohjautuen sille määritettiin WinNonlin-ohjelmalla (version 5.0.1, Pharsight) sopivin farmakokineettinen tilamalli ja laskettiin tilamallin farmakokineettiset parametrit, joita esim. kaksitilamallin kohdalla ovat eliminaation nopeusvakio (k_{10}), jakautumisen nopeusvakiot eli mikrovakiot (k_{12} ja k_{21}), sekä plasma pitoisuuden määrittämiseksi keskustilan jakautumistilavuus (V_1).

WinNonlinin (Pharsight) määrittämisissä oletettiin, että jos kirjallisuuslähteen tutkimuksessa laskimonsisäinen lääkkeen anto kesti 5 minuuttia tai alle, se luokiteltiin

injektioksi, ja jos se kesti yli 5 min, se luokiteltiin infuusioksi. Sovituksen (mallien/painotuksien) valinnassa tarkasteltiin havaitun ja ennustetun pitoisuus-aika-aineiston vastaavuutta, virhejakauman mallinnuksen onnistumista X-muuttujan arvojoukolle (X vs. weighted residual Y) ja variaatiokertoimia ennustetuille parametreille (mahd. pieni CV % < 50).

Käytetyn lähdeaineiston ja saatujen tuloksien luotettavuutta arvioitiin vertaamalla laskettuja arvoja, ja IV-artikkelissa esitettyjä lääkeaineen farmakokineettisiä parametreja verrattiin toisiinsa, sekä muualla kirjallisuudessa esitettyihin arvoihin.

3.2.3 Liuossimuloinnit

Liuossimulointeja varten rakennettiin simulaatiomalli, jossa huomioitiin ainoastaan lääkeaineliuoksen kulkeutuminen mahasuolikanavassa. Käytännössä mallin rakenteesta puuttui kiinteän lääkeaineen kulkeutuminen ja kaikki ainoastaan siihen liittyvät parametrit (kuva 1). Liuossimulaatioiden tarkoituksena oli testata mallin toimivuutta ja validoida mallin rakenne, sekä lääkeaineelle valitut/lasketut parametrit. Erityisesti tarkoituksena oli selvittää, millä tavoin määritettynä (yhtälö vs. kirjallisuusarvo) imeytymisen nopeusvakio parhaiten kuvasi ko. lääkeainetta. Liuossimulaatiosta saatua pitoisuuskuvaajaa verrattiin kirjallisuudesta etsittyihin *in vivo* liuoskuvaajiin (mielellään sama lähde, kuin iv-aineisto), ja niiden tuli olla mahdollisimman vastaavanlaiset.

3.2.4 Liukenemisen nopeusvakioden määrittäminen

Liukenemistä kuvaavan, kokeellisen aineiston perusteella piirrettiin kuvaajat havainnollistamaan formulaatioiden ja pH:n vaikutusta lääkeaineen vapautumiseen lääkevalmisteesta. Liukenemisen kuvaajista voitiin karkeasti arvioida liukenemisen nopeutta, kuinka paljon formulaatioiden liukeneminen poikkesi toisistaan, ja oliko poikkeavuus merkittävää. Liukenemisen voitiin katsoa olevan nopeaa, kun lääkeaineesta yli 85 % oli liuennut 30 minuutissa (EMA BE-ohjeisto 2010). Jos molempien valmisteiden kohdalla ≥ 85 % lääkeaineesta oli liuennut 15 minuutissa, voitiin liukenemisen kuvaajat todeta samankaltaisiksi (täydellinen liukeneminen saavutettu ennen mahan tyhjenemistä) (EMA BE-ohjeisto 2010). Kuvaajien

samankaltaisuuden arvioimiseksi laskettiin myös F2-arvo (similarity factor) BE-ohjeiston mukaisesti (EMA BE-ohjeisto 2010). Jos F2-arvo oli alle 50, formulaatioiden liukenemisen kuvaajat poikkesivat merkittävästi toisistaan, jos F2 oli välillä 50–100, olivat ne riittävän samankaltaiset.

Tämän jälkeen lääkeaineen kummallekin formulaatiolle laskettiin K_d -arvot WinNonlin-ohjelmalla (Pharsight). Liukenemisen mallintamisessa käytettiin ensimmäisen kertaluvun liukenemisen yhtälöä (kaava 3) tai Weibull-yhtälöä (kaava 4), joka on sopivampi sigmoidaalisille liukenemisen kuvaajille. K_d -arvon määrittämisessä käytetyn yhtälön tuli kuvata kokeellista liukenemisen kuvaajaa mahdollisimman hyvin. Tämä arvioitiin tarkastelemalla kuvaajia (havaittu vs. ennustettu) ja ennustettujen K_d -arvojen variaatiokertoimia.

Kaava 3: Ensimmäisen kertaluvun liukenemisen yhtälö

$$y = 1 - e^{(-K_d \times x)}$$

, jossa y = Lääkeaineen liuenneen osuus, x = Liukenemiseen kulunut aika ja K_d = Ensimmäisen kertaluvun liukenemisen nopeusvakio

Kaava 4: Weibull-yhtälö sigmoidaalisille liukenemisen kuvaajille

$$Kd = \left(\frac{Shape}{T_{diss}} \right) \times \left\{ \left(\frac{TIME}{T_{diss}} \right)^{(Shape - 1)} \right\}$$

, jossa Shape = Käyrän jyrkkyys ja T_{diss} = Aikapiste, jossa 63.2 % lääkeaineesta liuenneet, TIME = Aika piste, ja K_d = Weibull-yhtälön avulla kuvattu liukenemisen nopeusvakio.

Kuten liukoisuuskokeen kohdalla, myös K_d -arvon laskemisessa käytetty liukenemismenetelmä (pH) valittiin sen perusteella, mikä on fysiologisesti oikein, mahassa pH 1.2 ja suolessa pH 6.8.

3.2.5 Formulaatiosimuloinnit

Simulaatiomalliin lisättiin kiinteän aineen liukeneminen (ja liukoisuus), kulkeutuminen GI-kanavassa, sekä tarvittavat fysiologiset, lääkeaine- ja formulaatiokohtaiset parametrit

kuvan 1 ja kappaleessa 3.1 kerrotun mukaisesti. Formulaatiosimulaatioiden tuloksia verrattiin *in vivo* kirjallisuusaineistoon.

Formulaatiosimuloinnit tehtiin jokaisen lääkeaineen kohdalla kummallekin valmistetyypille (SU/MU), koska kaikissa tapauksissa ei ollut saatavilla tietoa valmistetyypistä. Samalla pystyttiin tarkastelemaan, kuinka suuri vaikutus formulaatiotyypillä ja siten mahan tyhjenemistavalla, oli kunkin lääkeaineen pitoisuusaiakuvaajiin.

3.2.6 Bioekvivalenssitutkimuksiin liittyvän riskiarvion laatiminen

Viranomaisohjeistojen (EMEA BE-ohjeisto 2010) mukaan bioekvivalenssitutkimuksen testi valmisteeseen katsotaan olevan bioekvivalentti referenssi valmisteeseen kanssa, jos niiden C_{\max} ja AUC parametrien (BE-parametrit) keskiarvojen suhteet ovat 0.8-1.25 90 % luottamusvälillä (ANOVA) (esim. C_{\max} testi/ C_{\max} referenssi). Tässä työssä kuitenkin oletettiin, että sellaiset lääkevalmisteet, joiden BE-parametrien testi/referenssi-suhteet (T/R-suhteet) olivat < 0.9 tai > 1.10 , saattoivat sisältää riskin *in vivo* bioekvivalenssitutkimuksissa epäonnistumiseen. Bioekvivalenssin toteutumiseen valittiin tiukempi raja (alle 10 %), koska tällöin riskiarvion jäi tilaa mm. mahdolliselle yksilöiden sisäiselle ja ulkoiselle vaihtelulle mahan tyhjenemisessä. C_{\max} ja AUC parametrit määritettiin kunkin valmisteeseen simulaatioprofiileista WinNonlinilla tilamallista riippumattomalla analyysitekniikalla (non compartmental analysis).

BE-tutkimukseen liittyvän riskin arvioimisessa tuli simulaatiotulosten lisäksi huomioida myös tehdyt oletukset (mm. malliin liittyen) ja niiden vaikutus simulaatiotulosten luotettavuuteen, sekä arvioida käytössä ollutta aineistoa, ja lääkeaineen ominaisuuksia. Näihin liittyvien seikkojen tarkempaa tutkimista ja havainnollistamista varten suoritettiin tarvittaessa herkkyysanalyysijä, joissa selvitettiin tiettyjen simulaatioparametrien (kuten mahan ja suolen Kd, GE, MU/SU) vaikutusta lääkeaineen pitoisuus-aiakuvaajaan (ainoastaan yhden parametrin arvoa haarukoitiin säilyttäen muut vakiona). Näissä herkkyysanalyysissä pyrittiin selvittämään ”pahin tilanne” (worst-case), eli kuinka paljon simulaatioparametrin olisi pitänyt muuttua (kasvaa/pienentyä), jotta BE-parametrien T/R-suhteessa näkyisi yli 10 % ero.

Tutkituille lääkevalmisteille oli käytössä myös aineistoa niiden vanhhoista *in vivo* BE-tutkimuksista (Orion). Näistä laskettiin, samaan tapaan, kuin simulaatiotuloksista, BE-parametrit ja niille T/R-suhteet. Simulaatio ja *in vivo* T/R-suhteita verrattiin keskenään ja arvioitiin tehdyn riskiarvion paikkaansa pitävyyttä ja toisaalta syitä simulaatio ja *in vivo* -kuvaajien mahdollisissa eroavaisuuksissa.

3.3 Tutkittavat lääkeaineet

Työssä tutkittiin neljää lääkeainetta, joiden lääkevalmisteille oli olemassa Orionin kokeellista liukenemisaineistoa ja BE-tutkimusten *in vivo* -aineistoa. Seuraavassa esitellään lääkeaineet ja niiden simulaatioita varten kerätty/laskettu data. Alla on myös taulukoituna (taulukko 1) jokaisen lääkeaineen tärkeimmät, tämän työn kannalta oleelliset, farmakokineettiset ja fysikaaliskemialliset ominaisuudet.

Taulukko 1: Tutkittujen lääkeaineiden fysikaaliskemiallisia ja farmakokineettisiä ominaisuuksia

Parametri	Parasetamoli	Alpratsolaami	Ibuprofeeni	Warfariini
PSA ^(*)	49	43	37	64
logD ₆ ^(*)	0.48	1.92	1.91	1.25
pKa	9.5 ⁽¹⁾	2.4 ⁽⁵⁾	4.5–4.6 ⁽⁹⁾	5.08 ⁽¹⁵⁾
logP (kokeellinen/ laskennallinen)	0.2/0.49 ⁽¹⁾	2.12/ 4.251 ⁽⁵⁾	3.68/3.14 ⁽¹⁰⁾	3/2.55 ⁽⁵⁾
BCS-luokka	I/III ⁽¹⁾	II	II ⁽¹⁰⁾	II
Liukoisuus (mg/ml)	vesi 37 °C: 23.7 ⁽¹⁾	pH 7: 0.04 ⁽⁵⁾ pH 1.2: 12 ⁽⁵⁾	pH 1: 0.038 ⁽¹⁰⁾ pH 6.8: 3.37 ⁽¹⁰⁾	pH 1.2: 0.008 ⁽¹⁶⁾ pH 7: 0.017 ⁽⁵⁾
Happo/emäs ominaisuudet	Heikko happo ⁽¹⁾	Heikko emäs ⁽⁵⁾	Heikko happo ⁽¹⁰⁾	Heikko happo ⁽¹⁵⁾
Annosriippu- vainen kinetiikka	EI	EI ⁽⁶⁾	KYLLÄ ⁽¹¹⁾	EI ⁽¹⁷⁾
Ensikierron- metabolia	KYLLÄ ⁽²⁾	EI ⁽⁷⁾	EI ⁽¹²⁾	EI ⁽¹⁸⁾
Biologinen hyötyosuus (BA)	0.63–0.89 ⁽³⁾	0.92 ⁽⁷⁾	1 ⁽¹²⁾	0.93 ⁽¹⁹⁾
Plasman proteiineihin sitoutuminen (%)	20–25 ⁽⁴⁾	70- 80 ⁽⁸⁾	99 ⁽¹³⁾	97–99 ⁽²⁰⁾
Eliminaation puoliintumisaika (h) (t 1/2)	1.9–4.3 ⁽¹⁾	10–12 ⁽⁷⁾	1.8-2 ⁽¹⁴⁾	35–45 ⁽²⁰⁾

Indikaatio	Tilapäiset kipuja kuumetilat ⁽¹⁾	Ahdistuneisuus ja paniikkihäiriöt ⁽²¹⁾	Tilapäiset kipuja kuumetilat, myös tulehduskipu ⁽²¹⁾	Laskimotukosten ja keuhkoemboolisaatioiden hoito ja esto ⁽²¹⁾
------------	---	---	---	--

^{*)}Orionilla talon sisäisesti ACD/Labs-ohjelmalla lasketut arvot

- 1) Kalanzi ym. 2006
- 2) Clements ym. 1984; Rawlins ym. 1977; Prescott, 1980
- 3) Annoksesta riippuen (500 mg-1g), Ameer ym. 1983; Clements ym. 1984; Forrest ym. 1982
- 4) Forrest ym. 1982
- 5) PhysProp:
<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00682>
- 6) Fleishaker ym. 1989
- 7) Smith ym. 1984
- 8) Greenblatt 1993
- 9) Higgins 2001

- 10) Potthast ym. 2005
- 11) Cheng ym. 1994; Paliwal ym. 1993; Lockwood ym. 1983
- 12) Davies 1998
- 13) Paliwal ym. 1993; Gabard ym. 1995; Smith ym. 1994
- 14) Adams ym. 1969
- 15) Stella ym. 1984
- 16) Orionin sis. eksperimentaalinen aineisto
- 17) O'Reilly ym. 1971
- 18) Andreasen ja Vesell 1974
- 19) Breckenridge ja Orme 1973
- 20) Palareti ja Legnani 1996
- 21) Lääkkeet ja Hinnat 2010

3.3.1 Parasetamoli

Winnonlin määrittysten perusteella kaksitilamalli kuvasi parasetamolien kinetiikkaa parhaiten. Valinta täsmäsi lähdeaineiston tilamallituksen kanssa (Eandi ym. 1984). Myös artikkelissa esitetyt farmakokineettiset parametrit vastasivat WinNonlinilla laskettuja arvoja (taulukko 2). Rinnastettaessa laskettuja ja lähdeartikkelissa esitettyjä parametrien arvoja muualle kirjallisuuteen havaittiin, että eliminaation nopeusvakio oli useimmiten esitetty pienemmäksi (mm. Ameer ym. 1982) ja keskustilan jakautumistilavuus selvästi suuremmaksi (Prescott 1980; Perucca and Richens 1979).

Taulukko 2: Parasetamolille lasketut farmakokineettiset parametrit IV-annon jälkeen ja niiden vertaaminen lähdeartikkelissa esitettyihin arvoihin.

Farmakokineettinen parametri	Lasketut arvot	Lähdeartikkelissa esitetyt ⁽¹⁾
k_{12} (1/h)	1.19	1.58
k_{21} (1/h)	2.34	3.99
V_1 (l)	24.2	24.9
k_{10} (1/h)	0.610	0.646

¹⁾ (Eandi ym. 1984)

Tutkittavat parasetamoli-formulaatit olivat testivalmiste Para-tabs 1g (Orion) ja sen referenssi Panadol Forte 1g (GlaxosmithKline Consumer Healthcare A/S). Kokeelliset liukenemiskokeen tulokset oli saatavilla Para-Tabsille ainoastaan pH:ssa 5,8, mutta

Panadol Fortelle koko fysiologisella pH-alueella (1.2, 4.5, 5.8 ja 6.8). Näiden perusteella Para-Tabs oli nopeasti liukeneva pH:ssa 5.8 ($\geq 85\%$ 15 min) ja Panadol Forte koko fysiologisella pH-alueella ($\geq 85\%$ 15 min).

Laskettu F2-arvo 69.63 oli sallitulla välillä (EMEA BE-ohjeisto 2010), joten valmisteiden liukenemisen kuvaajat pH:ssa 5.8 eivät eronneet merkittävästi toisistaan.

K_d-arvot laskettiin WinNonlinilla ensimmäistä kertalukua noudattavan liukenemisen laskukaavan avulla. Parasetamoli-valmisteiden liukenemisen nopeusvakion arvot pH:ssa 5.8 olivat 8.3 h⁻¹ testivalmisteelle ja 10.2 h⁻¹ referenssivalmisteelle. Panadol Fortelle K_d-arvot muissa pH-tasoissa, eli 1.2, 4.5, ja 6.8 olivat 10.5, 10.3 ja 12.9 h⁻¹, tässä järjestyksessä.

3.3.2 Alpratsolaami

Kaksitilamallin havaittiin olevan sopivin kuvaamaan alpratsolaamin farmakokinetiikkaa. Myös lähdeartikkelissa (Smith ym. 1984) käytettiin kaksitilasoitusta. Taulukosta 3 nähdään, että lähdeartikkelissa alpratsolaamin eliminaation nopeusvakion arvo oli monikertainen laskettuihin verrattuna. Jakautumistilavuus puolestaan oli simulaatiossa suhteellisen pieni verrattuna lähdeartikkelin arvoon. Samansuuntaiset poikkeamat esiintyivät myös verrattaessa laskettuja arvoja muualla kirjallisuudessa esitettyihin (Fleishaker ym. 1989). Erot saattoivat johtua lähdeartikkelin pitoisuus-aikakuvaajien epätarkkuudesta.

Tutkittavat alpratsolaami-formulaatiot olivat testivalmiste Alprox 1 mg (Orion) ja referenssivalmiste Xanor 1mg (Pfizer). Saatavilla oli liukenemiskokeiden tulokset pH:issa 4.5, 6.0 ja 6.8. Liukenemiskokeissa ongelmana oli ollut alpratsolaamin hajoaminen happamassa pH:ssa 1.2 (hydrolyysi), jonka takia tuloksia tässä pH:ssa ei ollut saatavilla. Myös kirjallisuudessa on esitetty, että alpratsolaami hydrolysoituu happamissa vesiliuoksissa (Cho ym. 1986).

Liukenemiskokeen tuloksista piirretyt kuvaajat olivat kaikissa tutkituissa pH-tasoissa hyvin samankaltaisia molemmilla valmisteilla, mutta myös valmisteiden välillä. Lisäksi

niiden perusteella liukeneminen oli nopeaa ($\geq 85\%$ 15 min). Myös lasketut F2-arvot olivat annetuissa rajoissa (EMEA BE-ohjeisto 2010). K_d-arvot laskettiin WinNonlinilla ensimmäistä kertalukua noudattavan liukenemisen laskukaavan avulla. Kaikissa pH-tasoissa molempien formulaatioiden K_d-arvot olivat välillä 10.2 ja 13.3 1/h.

Taulukko 3: Alpratsolaamille lasketut farmakokineettiset parametrit IV-annon jälkeen ja niiden vertaaminen lähdeartikkelissa esitettyihin arvoihin.

Farmakokineettinen parametri	Lasketut arvot	Lähdeartikkelissa esitetty ⁽¹⁾
k ₁₂	1.50	-
k ₂₁	2.53	-
V1 (l)	33.8	50.4
k ₁₀ (1/h)	0.103	0.592

¹⁾ (Smith ym. 1984)

3.3.3 Ibuprofeeni

Määrittysten perusteella ibuprofeenin farmakokineettikkaa kuvasi parhaiten kaksitilamalli, mikä oli sama, kuin lähdeartikkelin sovitus (Martin ym. 1990). Myös WinNonlinilla laskettujen farmakokineettisten parametrien arvot vastasivat lähdeartikkelissa mainittuja (taulukko 4). Poikkeuksena eliminaation nopeusvakio, joka oli lähdeartikkelissa selvästi laskettua arvoa pienempi. Ibuprofeenille ei löytynyt muuta vertailevaa IV-lähdekirjallisuutta.

Ibuprofeeni-valmisteiden kohdalla testivalmisteena toimi Burana 400 mg ja 600 mg (Orion) ja referenssivalmisteena Brufen 400mg ja 600mg (Abbott).

Taulukko 4: Ibuprofeenille lasketut farmakokineettiset parametrit IV-annon jälkeen ja niiden vertaaminen lähdeartikkelissa esitettyihin arvoihin.

Farmakokineettinen parametri	Lasketut arvot	Lähdeartikkelissa esitetty ⁽¹⁾
k ₁₂	5.54	-
k ₂₁	7.75	-
V1 (l)	4.4	5.0
k ₁₀ (1/h)	0.779	0.442

¹⁾ (Martin ym. 1990)

Saatavilla oli liukenemiskokeen tulokset ainoastaan pH:ssa 7.2. Tuloksista piirretyistä kuvaajista havaittiin, että kummankin vahvuuden molempien formulaatioiden liukeneminen oli nopeaa ko. pH:ssa ($\geq 85\%$ 15 min). Kuvaajista havaittiin myös, että 600 mg valmisteiden välillä oli pientä eroa liukenemisen kuvaajissa 10 minuutin aikapisteessä, Buranan liukenemisen ollessa hitaampaa. Muuten lääkkeen vapautuminen Burana 600 mg ja Brufen 600mg tableteista oli samankaltaista. 400 mg formulaatioissa ei näkynyt minkäänlaista merkitsevää eroa liukenemisen kuvaajissa. 400 mg valmisteiden liukenemisen F2-arvo oli 96.0 ja 600 mg valmisteiden 48.9. Näin ollen, 400 mg formulaatioiden liukenemisen kuvaajat olivat riittävän samankaltaiset, mutta 600mg eivät täyttäneet kriteereitä (EMA BE-ohjeisto 2010).

Kd-arvot laskettiin WinNonlinilla ensimmäistä kertalukua noudattavan liukenemisen laskukaavan avulla. Burana 400 mg kohdalla joidenkin tablettien liukeneminen saavutti tutkitulla aikavälillä yli 100 % (tableteissa epätasainen määrä lääkeainetta), jolloin Winnonlinilla ei pystytty laskemaan keskiarvoaineistolle Kd-arvoja. Tästä syystä laskettiin yksittäisten 400 mg tablettien liukenemistuloksista Kd-arvot ja niistä, joille Winnonlin muodosti Kd-arvot, laskettiin keskiarvo, mitä sitten käytettiin simuloinneissa. Burana 400mg Kd-arvoksi saatiin 34.2 h^{-1} ja 600mg Kd-arvoksi 7.6 h^{-1} ja Brufenin 400mg ja 600mg formulaatioille vastaavat arvot olivat 28.3 ja 14.7 h^{-1} .

3.3.4 Varfariini

IV-lähdeartikkelin tutkimuksessa kaikki tutkittavat eivät saaneet samaa varfariini annosta, vaan se vaihteli välillä 50–600 mg, eli kyseessä olivat myös tavanomaista suuremmat annokset (yleensä 1-5mg) (O'Reilly ym. 1971). Lisäksi plasmanäytteiden lukumäärä vaihteli eri tutkimushenkilöillä. Tämän takia tutkimuksen tulokset esiteltiin lähdeartikkelissa jokaiselle tutkittavalle erikseen (pitoisuus-aikapisteet ja farmakokineettiset parametrit) (O'Reilly ym. 1971).

Simulointia varten tarvittavat farmakokineettiset parametrit laskettiin ainoastaan kahden henkilön aineiston perusteella (annokset 100 ja 200 mg), koska heillä oli eniten plasmanäytepisteitä. Parhaimman sovituksen antoi kaksitilamalli, mitä päädyttiin

käyttämään parametrien määrittämissä (taulukko 5). Samaa käytettiin myös lähdeartikkelissa.

Taulukko 5: Varfariinille lasketut farmakokineettiset parametrit IV-annon jälkeen ja niiden vertaaminen lähdeartikkelissa esitettyihin arvoihin.

Farmakokineettinen parametri	Lasketut arvot (henkilö 4)	Lasketut arvot (henkilö 5)	Lähdeartikkelissa esitetty ⁽¹⁾ (henkilö 4)	Lähdeartikkelissa esitetty ⁽¹⁾ (henkilö 5)
k_{12}	0.149	1.45	0.130	2.12
k_{21}	0.266	1.38	0.246	1.58
V_1 (l)	5.66	3.57	5.78	3.07
k_{10} (1/h)	0.0271	0.0311	0.0270	0.0366

¹⁾ (O'Reilly ym. 1971)

Parametrien arvot vastasivat hyvin lähdeaineistossa annettuja (taulukko 5), kuitenkin, verrattessa muuhun kirjallisuuteen, sekä lasketut, että lähdeartikkelin jakautumistilavuuden arvot olivat suhteellisen pieniä verrattuna muuhun kirjallisuuteen (V_1 arvoksi esitetty noin 12L) (Andreasen ja Vesell 1974; O'Reilly ym. 1963). Sen sijaan k_{10} oli suurempi muuhun iv-annon jälkeiseen kirjallisuusaineistoon nähden (noin 0.019 1/h) (Andreasen and Vesell 1974; O'Reilly ym. 1963).

Tutkittavat varfariini-valmisteet olivat testivalmiste Marevan 1mg (Orion) ja referenssivalmiste Coumadin 2mg (Bristol-Myers Squibb). 1 mg varfariini-valmisteelle ei ollut markkinoilla vastaavan vahvuista referenssivalmistetta, ja siksi jouduttiin käyttämään verrokkina 2mg valmistetta.

K_d -arvojen määrittämistä varten saatavilla oli liukenemiskokeen tulokset molemmille valmisteille useissa eri puskuriliuoksissa (pH-tasot 1.2, 4.5 ja 6.8), sekä vedessä. Liukenemiskokeissa käytettiin Marevanin kohdalla yhtä 1mg tablettia, koska Orionilla oli tutkittu, että yhden 1mg tabletin vs. kahden 1 mg tabletin liukeneminen oli samankaltaista. Coumadiinin kohdalla liukenemiskokeissa käytettiin yhtä 2 mg tablettia.

Liukenemisen kuvaajista havaittiin, että Marevanin liukeneminen oli hyvin nopeaa ja samankaltaista pH:sta riippumatta (≥ 85 % 15 min). Coumadiinin liukeneminen sen sijaan oli selvästi hitaampaa pH:ssa 1.2 ja 4.5 (18 ja 25 % 15 min) ja toisaalta sen

kuvaajat jäivät kesken, koska 30 minuutin tutkimuksen aikana liuennut lääkeainemäärä ei saavuttanut tasapainotasoa (pH 1: 49 % ja pH 4.5: 65 % lääkeaineesta liuennut). Testi ja referenssi formulaatioille lasketut F2-arvot olivat alle 50 kaikissa tutkituissa pH-tasoissa, joten niidenkään perusteella liukenemisen kuvaajat eivät olleet riittävän samankaltaiset (EMEA BE-ohjeisto 2010). Mitä happamampi pH oli, sitä huonompi oli liukenemisen kuvaajien F2-arvo.

Coumadiinin K_d-arvoja ei pystytty laskemaan luotettavasti ensimmäisen kertaluvun tai Weibullin yhtälöllä alhaisissa pH:issa (1.2. ja 4.5). Huomioiden varfariinin fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (heikko happo, BCS II), sekä sen, että tutkittujen valmisteiden liukeneminen erosi merkittävästi toisistaan, oli oletettavaa, että liukeneminen olisi merkittävä tekijä simulaatioiden ja toisaalta BE-riskiarvion luotettavuuden kannalta. Näin ollen liukenemiselle päädyttiin tekemään teoreettisia simulaatioita, joiden avulla valittiin parhaiten kokeellisen (ensimmäisen kertaluvun) liukenemisen kuvaajan lineaarista linjaa kuvaava K_d-arvo. Coumadiinille saatiin haarukoitua uudet K_d-arvot, jotka olivat 1.8 h⁻¹ (pH 1.2) ja 2.7 h⁻¹ (pH 4.5). Marevanille vastaavat arvot olivat 8.5 ja 9.9 h⁻¹. Coumadiinin K_d pH:ssa 6.8 oli 6.1 h⁻¹ ja Marevanille vastaava arvo oli 12.4 h⁻¹.

4 TULOKSET

4.1 Parasetamoli

4.1.1 Ka-arvon valinta ja liuossimuloinnit

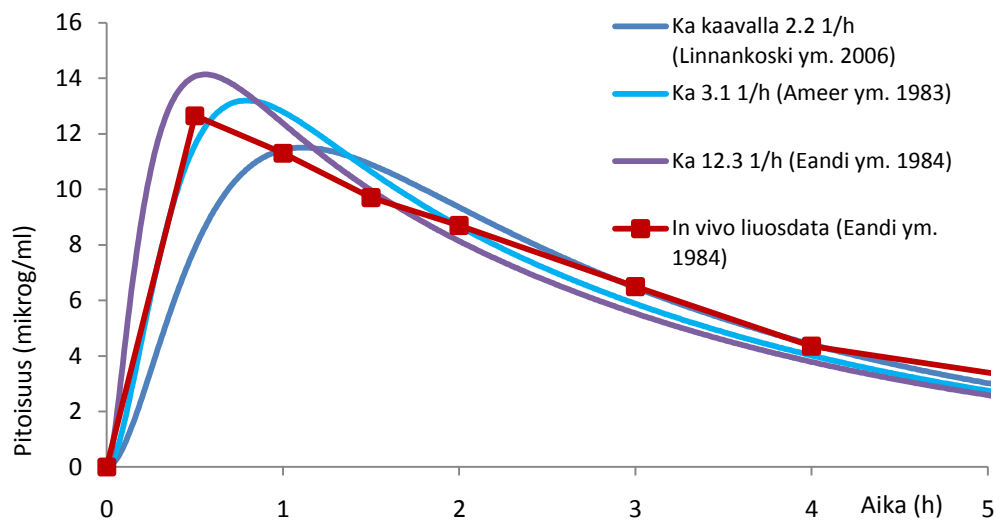
Parasetamolin liuossimulointien tuloksia verrattiin *in vivo* liuosaineistoon, joka oli samasta lähteestä, kuin sen IV-aineisto (Eandi ym. 1984), ja siten tehty samoille koehenkilöille. Lähteessä parasetamolin liuosannos oli 1 g (Eandi ym. 1984), mikä vastasi simulaatioissa ja Orionin BE-tutkimuksissa käytettyä annoskokoa.

Parasetamolilla esiintyy ensikierronmetaboliala, joten ”maksalaatikkomalli” (kuvattu kappaleessa 3.1.2) vastasi paremmin *in vivo* liuosaineisto, kuin alkuperäinen simulaatiomalli. Koska parasetamolin vaillinaisen hyötyosuuden on esitetty johtuvan

ensikierronmetaboliasta (Kalanzi ym. 2006), sen ensikierronmetabolian osuudeksi arvioitiin 0.37 (Eandi ym. 1984).

Kaavalla (Linnankoski ym. 2006) määritetty K_a -arvo (2.2 h^{-1}) oli suhteellisen pieni ja sen simulaatiokuvaaja jäi selvästi alemmalle tasolle, kuin *in vivo* liuoskuvaaja (kuva 4). Siinä myös imeytymisnopeus oli selvästi hitaampaa verrattuna *in vivo* liuoskuvaajaan. Parasetamolin imeytymisen nopeusvakion arvo päädyttiinkin ottamaan suoraan kirjallisuudesta ja testattiin useista lähteistä peräisin olevia K_a -arvoja, koska alkuperäisestä liuoksen *in vivo* aineistosta saatu K_a -arvo oli epätavallisen suuri (12.3 h^{-1}). Tutkituista kirjallisuusarvoista valittiin lopulta 3.1 h^{-1} (Ameer ym. 1983).

Kaiken kaikkiaan liuossimulointien perusteella voitiin todeta, että lasketut farmakokineettiset parametrit ja valittu tilamalli kuvasivat parasetamolia riittävän hyvin. Lisäksi havaittiin, että parasetamolin simulaatiokuvaajat olivat herkkiä imeytymisnopeuden muutoksille.



Kuva 4: Parasetamolin liuossimuloinneista (maksalaatikkomalli) saadut kuvaajat eri K_a -arvoilla ja niiden vertaaminen *in vivo* liuosaineistoon (Eandi ym. 1984).

4.1.2 Formulaatiosimuloinnit

Koska liukeneminen oli nopeaa molemmille parasetamolin formulaatioille ja liukenemistutkimukset oli tehty vain yhdessä pH:ssa, ne eivät juuri lainkaan erotelleet

formulaatioita. Tästä syystä parasetamolin saadut pitoisuus-aikakuvaajat (testi vs. referenssi) olivat hyvin samankaltaiset ja kuvaajat täysin päällekkäin (kuva 5). Valmistetyyppi (MU/SU) ei vaikuttanut simulaatiokuvaajiin.

4.1.3 BE-riskiarvio

Parasetamolin MU-formulaatioiden simulaatiotuloksista määritettiin molemmille lääkevalmisteille C_{max} ja AUC ja arvoille laskettiin testi/referenssi-suhteet (T/R-suhteet) (taulukko 6). T/R-suhteelle annettujen kriteerien mukaan (kappale 3.2.7) valmisteet näyttivät olevan simulaatioissa bioekvivalentit, ja ainoastaan tämän perusteella voisi olettaa, ettei riskiä epäonnistua *in vivo* bioekvivalenttitutkimuksessa olisi. Luotettavan riskiarvion laatimiseksi arvioitiin myös muita siihen mahdollisesti vaikuttavia tekijöitä, joita käsitellään seuraavassa.

Taulukko 6: Parasetamoli-valmisteiden simulaatiotuloksista lasketut BE-parametrien ennustetut testi/referenssi-suhteet.

BE-parametri	T/R-suhde
C_{max}	0.99
AUC	1.00

On tutkittu, että konventionaalisten parasetamoli tablettien imeytymisnopeutta ja vaikutuksen alkamisajankohtaa kontrolloi mahan tyhjenemisnopeus (Heading ym. 1973). Tästä syystä erot siinä, miten parasetamoli-valmiste hajoaa ja lääkeaine vapautuu formulaatiosta mahan happamassa pH:ssa, saattavat vaikuttaa sen imeytymisprosessin varhaisiin vaiheisiin, jolloin riski BE-tutkimuksessa epäonnistumiseen kasvaa. Tämä koskee tilanteita, joissa formulaatioiden apuaineet (hajotusaineet) ja/tai valmistetyyppi (rakeistus vs. suorapuristus) eroavat selkeästi toisistaan, sillä nopeasti liukeneva ja pieniksi partikkeleiksi dispergoituva parasetamoli-valmiste läpäisisi mahaportin aikaisemmin verrattuna huonosti mahassa liukenevaan/dispergoituvaan valmisteeseen.

Tutkittujen parasetamoli-valmisteiden formulaatioista oli saatavilla tarkempaa tietoa ainoastaan Para-Tabs 1 g testivalmisteesta. Sen tabletissa oli kalvopäällyste, joka oli

PVA/vesi-pohjainen. Orionilla aikaisemmin tehtyjen tutkimusten perusteella ko. päällysteen ei pitäisi vaikuttaa merkittävästi valmisteen liukenemiseen tai hajoamisaikaan. Lisäksi Para-Tabsin ytimen valmistusprosessiin kuului märkärakeistus gelatiinilimalla. Kun parasetamoli-valmisteille tehtiin simulaatioita vaihtelemalla simulaatioparametreja valmistetyypin mukaan (MU/SU), havaittiin, ettei tällä ollut vaikutusta niiden pitoisuus-aikakuvaajiin. Näin ollen oli oletettavaa, ettei valmistetyyppi vaikuttanut myöskään mallin erottelukykyyn.

Joidenkin apuaineiden (esim. natriumbikarbonaatti, makeutusaineet) on tutkittu muuttavan mahan tyhjenemisnopeutta ja siten vaikuttavan lääkeaineen imeytymisnopeuteen (Kalanzi ym. 2006; Grattan ym. 2000; Stillings ym. 2000), joten tätäkin seikkaa tutkittiin mahdollisena mallin erottelukykyä heikentävänä tekijänä. Havaittiin, etteivät Para-Tabs 1 g ja Panadol 1 g forte, sisältämät apuaineet merkittävästi eronneet toisistaan, ja lisäksi molempien apuaineet oli mainittu parasetamolin biowaiver-monografiassa (Kalantzi ym. 2006) esitettyssä listassa, johon on lueteltu sellaiset apuaineet, joita onnistuneiden BE-tutkimusten valmisteet ovat sisältäneet. Jotta mahan tyhjenemisnopeuden vaikutuksia MU-valmisteiden erotteluun voitiin selvittää konkreettisemmin, asiaa tutkittiin vielä herkkyysanalyysin avulla vaihtelemalla simulaatioissa GE-parametrin arvoa. Osoittautui, ettei tekijällä ollut juuri lainkaan vaikutusta bioekvivalenssin parametreihin (C_{max} ja AUC), vaikka mahan tyhjenemisnopeuden olisi kasvattanut tai pienentänyt hyvinkin merkittävästi. Mahan tyhjenemiseen liittyy toki myös yksilöiden välistä vaihtelua, mutta ko. herkkyysanalyysi kumosi myös tähän seikkaan liittyvät riskit.

Parasetamolin testivalmisteelle ei ollut saatavilla tuloksia liukenemisestä, kuin yhdessä pH:ssa (5.8), jolloin sen K_d -arvo oli sama mahassa ja suolessa. Tämän seikan ei kuitenkaan olettaisi vaikuttavan simulaatiomallin erottelukykyyn parasetamolin kohdalla useastakin tekijästä johtuen. Ensiksikin on huomioitava, että koska parasetamoli on BCS-luokan I/III lääkeaine, sen *in vivo* imeytymistä rajoittavia tekijöitä ovat yleensä mahan tyhjenemisnopeus tai permeabiliteetti suolessa, ei liukeneminen (Kalantzi ym. 2006). Lisäksi monien liukenemisen tutkimusmenetelmien on kritisoitu olevan turhan erottelevia näiden BCS-luokkien IR-lääkevalmisteille (Story 1996; Polli

ym. 1996). Lisäksi tiedetään parasetamolien liukoisuuden olevan hyvää koko fysiologisella pH-alueella ja sen pääasiallinen liukenemispaikka on maha (Shaw ym. 2005). Näin ollen myöskään sen liukoisuus ei vaikuta liukenemiseen ja siten permeaatioon. Panadol Forten eksperimentaalisesta liukenemisaineistosta nähtiinkin, että liukeneminen pH:ssa 1.2 oli lähes yhtä nopeaa, kuin pH:ssa 6.8 (Kd arvot lähes samat), ja koska tukittujen formulaatioiden välillä ei ollut huomattavia eroja apuaineissa, voisi olettaa myös Para-Tabsin liukenemisen olevan samankaltaista (yhtä nopeaa) mahassa, kuin Panadolin.

Parasetamolilla on esitetty imeytyvän ohutsuolen lisäksi vähäisessä määrin myös mahasta (Shanker ym. 1957). Tutkimusten mukaan imeytymistä tapahtuu hieman myös paksusuolesta (Eandi ym. 1984). Näitä imeytymisalueita ei simulaatiomallissa huomioitu. Mahasta imeytyminen saattaisi vaikuttaa BE-riskiin erityisesti tilanteessa, jossa lääkeainetta pääsisi vapautumaan mahassa toisesta valmisteesta aikaisemmin, jolloin myös sen imeytyminen alkaisi aikaisemmin. Asian tutkimiseksi tehtiin karrikoituja simulaatioita, joissa parasetamolia imeytyi myös mahasta. Mahan pinta-ala on noin 1 m^2 (Rowland ja Tozer 1995), mutta arvoksi on esitetty kirjallisuudessa myös 0.11 m^2 (Avdeef 2001). Näin ollen, koska ohutsuolen pinta-ala on noin 200 m^2 , simulaatioissa mahan imeytymisen nopeusvakion määritettiin olevan $\frac{1}{200}$ -osa ohutsuolen imeytymisen nopeusvakion arvosta. Simulaatiot eivät kuitenkaan vaikuttaneet pitoisuus-aikaprofiileihin. Simulaatioita suoritettiin vielä merkittävästi kasvatetulla mahan K_a -arvolla (sama kuin suolessa). Tässäkin tapauksessa mahasta imeytyminen kasvatti ainoastaan häviävän vähän C_{\max} -arvoa, ja aikaisti T_{\max} -ajankohtaa. Fysiologiaan pohjautuen (mahan pinta-alan ollessa merkityksettömän pieni ohutsuolen pinta-alaan verrattuna), parasetamolien mahasta imeytyminen *in vivo* ei todennäköisesti ole merkittävää, eikä vaikuta BE-riskiarvion luotettavuuteen. Myöskään paksusuolesta imeytymisen lisääminen malliin ei muuttanut simulaatiokäyriä lainkaan, koska tutkittiin IR-formulaatioita, jolloin kaikki lääkeaine oli imeytynyt jo ennen saapumistaan paksusuoleen.

Kaikki edellä pohditut, riskiarvion vaikuttavat tekijät, ja mahdollisesti parasetamoli-valmisteiden kohdalla mallin erotteluun vaikuttavat seikat huomioiden, saadut

simulaatiotulokset voidaan todeta luotettaviksi. Malli näyttäisi parasetamolien kohdalla, erottelevan valmisteet luotettavasti toisistaan, eikä näin ollen riskiä BE-tutkimuksessa epäonnistumiseen näyttäisi edelleenkaan olevan.

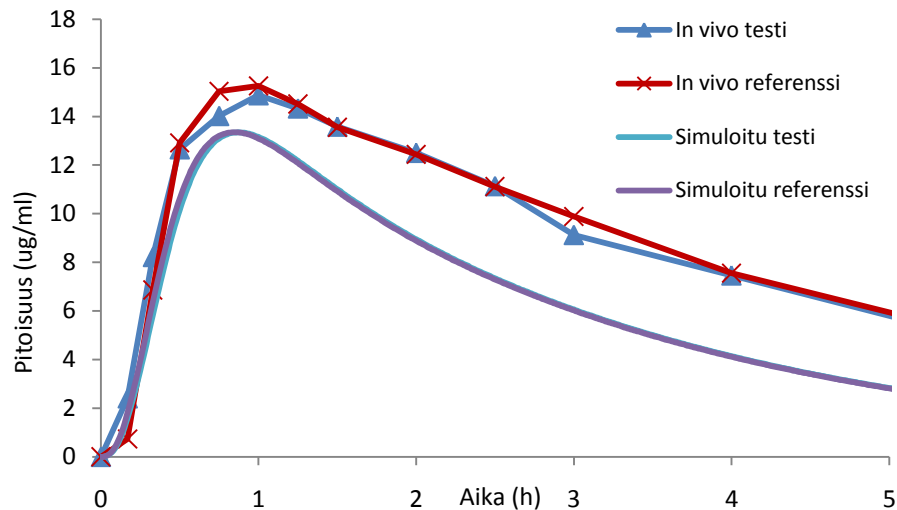
4.1.4 Simulaatioiden vertailu *in vivo* BE-tutkimukseen

Orionilla tehdystä BE-tutkimusaineistosta laskettiin parasetamolille BE-parametrit ja niille T/R-suhde, samaan tapaan, kuin edellä simulaatiotuloksista (taulukko 7). Saatujen T/R-suhteiden perusteella valmisteet olivat bioekvivalentit myös *in vivo*, mikä vahvistaa simulaatioiden ja muiden riskiarvion vaikuttavien tekijöiden perusteella tehdyn päätelmän oikeaksi.

Taulukko 7: Parasetamoli-valmisteiden *in vivo* BE-tutkimusaineistosta lasketut BE-parametrien testi/referenssi-suhteet ja suluissa ennustetut suhteet.

BE-parametri	T/R-suhde
C _{max}	0.97 (0.99)
AUC	0.98 (1.00)

Simuloidut parasetamolien pitoisuus-aikakuvaajat erosivat jonkin verran *in vivo* BE-kokeen kuvaajista (kuva 5) simuloitujen kuvaajien jäädessä alemmalle tasolle verrattuna *in vivo* kuvaajiin. Lisäsimuloinneilla havaittiin ensikierronmetabolian osuuden pienentämisen nostavan simuloitua pitoisuus-aikakuvaajaa kohti *in vivo*-käyrän tasoa. Tällä seikalla ei kuitenkaan ollut vaikutusta BE-riskiarvion. Edelleen, kuvaajien simuloitu vs. *in vivo* imeytymisvaiheet näyttivät olevan melko samankaltaiset, sen sijaan eliminaatiovaihe oli simuloituissa nopeampi (K_{10} 0.61 h⁻¹) (kuva 5). Kun tehtiin simulaatioita eri K_{10} -arvoilla, eliminaation nopeusvakion pienentäminen (eliminaation hidastamisen) kasvatti selkeästi simuloituja C_{max}- ja T_{max}-arvoja kohti *in vivo* vastaavia ja muutti sen muotoa paremmin *in vivo* kuvaajaa vastaavaksi. Lisäksi *in vivo* kuvaajissa testi ja referenssi valmisteiden välillä havaittiin pientä eroa, mikä saattoi johtua siitä, että molempien valmisteiden aineistossa esiintyi hyvin suurta yksilöiden välistä vaihtelua, millä on vaikutusta keskiarvoaineistoon.



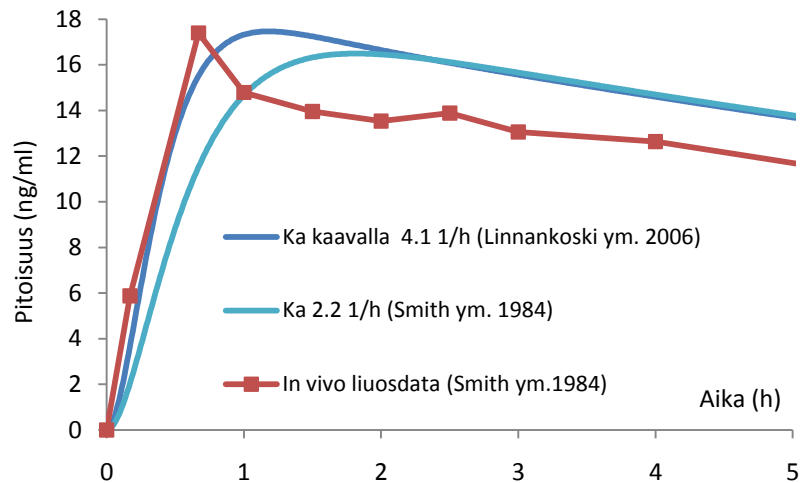
Kuva 5: Parasetamolien formulaatioiden simulaatiokuvaajat vs. vastaavat in vivo BE-tutkimuksen kuvaajat.

4.2 Alpratsolaami

4.2.1 K_a -arvon valinta ja liuossimuloinnit

Alpratsolaamille ei löytynyt kirjallisuudesta sopivaa p.o. liuosaineistoa *in vivo*. Kirjallisuudessa oli kuitenkin maininta siitä, että lääkkeenantoreitti tai lääkekuoto ei merkittävästi vaikuta alpratsolaamin imeytymiseen, joten vertailukohtana käytettiin alpratsolaamin IR-tabletin (1 mg) annon jälkeistä aineistoa (Smith ym. 1984). Kyseessä oli sama lähdetutkimus, kuin IV-annossa, joten tutkimusasetelma ja olosuhteet alpratsolaamin IR-tabletille olivat täysin vastaavat IV-annon kanssa (kappale 3.3.2.2).

Simulaatioissa käytettiin perinteistä mallia. Simulaatioissa imeytymisen nopeusvakioksi kokeiltiin kahta arvoa, eli kaavalla (Linnankoski ym., 2006) määritettyä (4.1 h^{-1}) ja kirjallisuudesta saatua (2.2 h^{-1}) (Smith ym. 1984) (kuva 6). K_a -arvoksi valittiin kaavalla laskettu, eli 4.1 h^{-1} .



Kuva 6: Alpratsolaamin liuossimulaation kuvaajat vs. in vivo liuoskuvaaja

4.2.2 Formulaatiosimuloinnit

Tutkittujen alpratsolaami-formulaatioiden liukeneminen oli hyvin samankaltaista, kuten siis myös niiden K_d -arvot. Lisäksi liukeneminen oli melko nopeaa. Tästä syystä formulaatiosimuloinneissa saatiin odotetusti täysin samanlaiset kuvaajat molemmille valmisteille (kuva 7). Valmistetyyppi (MU/SU) ei vaikuttanut simulaatiokuvaajiin.

4.2.3 BE-riskiarvio

Simulaatiotuloksista määritettiin BE-parametrit ja niiden arvoille laskettiin T/R-suhteet (taulukko 8). T/R-suhteelle annettujen kriteerien pohjalta (kappale 3.2.7) voitiin todeta valmisteiden olevan simulaatioissa bioekvivalentit, ja pelkästään niiden perusteella riskiä in vivo bioekvivalenssitutkimuksessa epäonnistumiseen olisi. Seuraavassa pohditaan muita alpratsolaamin BE-riskiarvioon ja sen luotettavuuteen vaikuttavia tekijöitä.

Taulukko 8: Alpratsolaami-valmisteiden simulaatiotuloksista lasketut BE-parametrien ennustetut testi/referenssi-suhteet.

BE-parametri	T/R-suhde
Cmax	0.99
AUC	1.00

Alpartsolaamin liukoisuus ja siten liukeneminen ovat pH:sta riippuvaisia (Laihanen ym. 1996). Simulaatioissa käytetty mahan K_d -arvo jouduttiin laskemaan pH:ssa 4.5 tehdystä liukenemisen tutkimusaineistosta (ei ollut fysiologisesti täysin pätevä). Tästä seikasta mahdollisesti syntyvää riskiä mallin erottelukykyyn lievensi se, että kaikissa tutkituissa väliaineissa (4.5, 6.0 ja 6.8) liukeneminen testi vs. referenssi formulaatioille oli lähes täysin samankaltaista (K_d -arvot lähes samat) ja liukeneminen oli nopeaa. Lisäksi on huomioitava alpratsolaamin fysikaaliskemialliset ominaisuudet. Se on heikko emäs (pKa 2.4) ja liukenee siten paremmin happamassa pH:ssa. Tämän perusteella K_d -arvo mahassa tuskin ainakaan pienenisi siitä, mitä se oli suolessa tai pH:ssa 4.5.

Fysiologisesti pätevän mahan K_d -arvon puuttumisen vaikutusta simulaatiokuvaajiin ja formulaatioiden erotteluun tutkittiin vielä tarkemmin herkkyysanalyysillä. Havaittiin, ettei K_d -arvon suurentaminen vaikuttanut kuvaajaan lainkaan. K_d -arvon selvä pienentäminen (10.-osa alkuperäisestä) kasvatti T_{max} :ia, muttei myöskään vaikuttanut C_{max} -arvoon. Näin ollen tällä tekijällä tuskin oli vaikutusta mallin erottelukykyyn.

Alpratsolaamin kidemuodon on tutkittu vaikuttavan sen liukoisuuteen ja näin ollen kidemuoto vaikuttaa myös alpratsolaamin liukenemiseen (Laihanen ym. 1996). Tämä johtuu siitä, että eri kidemuodot vaikuttavat lääkeaineen kiinteän muodon pinta-alaan. On myös tutkittu, että hydraattimuodon liukoisuus on alhaisempi verrattuna anhydraattimuotoon, mikä saattaa johtua hydraatin muodostukseen liittyvästä tapahtumasarjasta, jolloin alpratsolaamin ja veden molekyylit ovat valmiiksi vuorovaikutuksessa keskenään. Lisäksi erot lääkeaineen kidemuodosta riippuvaisissa fysikaaliskemiallisissa ominaisuuksissa (säilyvyys, muutokset tuotannossa) voivat merkittävästi vaikuttaa eroihin lääkeformulaatioiden biologisessa hyötyosuudessa. Anhydraattimuotojen on havaittu muodostavan toistettavampia plasmapitoisuuksia verrattuna hydraattimuotojen varioiviin plasmapitoisuuksiin.

Tässä työssä tutkittujen formulaatioiden alpratsolaamin kidemuodoista ei ollut saatavilla tietoa. Lisäksi alpratsolaamin simulaatioissa jouduttiin käyttämään vesiliukoisuuden arvoja eri pH-tasoissa, koska sille ei ollut saatavilla tarkempia, puskuriliuoksissa tehtyjä, liukoisuusmittauksia. Tutkittaessa herkkyysanalyysillä, kuinka paljon

kidemuodosta mahdollisesti aiheutuvat liukoisuuserot tai liuosaineiston epätarkkuus voisivat vaikuttaa mallin formulaatioiden erottelukykyyyn (liukenemisnopeuteen), havaittiin, että mahan ja suolen liukoisuus arvojen merkittäväkään vaihtelu (jakaminen/kertominen 10 ja 100) ei muuttanut pitoisuuskuvaajia lainkaan. Tutkittujen liukoisuusarvojen perusteella liukoisuus ei siis ollut tällä alpratsolaamin annoksella (1 mg) imeytymistä rajoittava tekijä.

Alpratsolaami on potentti lääkeaine, joten sitä tarvitaan formulaatioon suhteessa hyvin vähän. Tämän takia apuaineilla saattaa olla suuri vaikutus valmisteen ja toisaalta itse lääkeaineen kulkeutumiseen ja käyttäytymiseen elimistössä. Näin ollen epätarkkuutta simulaatiomallin erottelukykyyyn saattaisi aiheuttaa selkeät erot alpratsolaami-formulaatioiden apuaineissa ja/tai valmistustekniikassa. Esimerkiksi apuaineista johtuvien mahan sisällön pH vaihtelujen on esitetty joissain tapauksissa vaikuttavan oleellisesti alpratsolaamin liuenneeseen pitoisuuteen, ja sitä kautta myös imeytymiseen, johtuen alpratsolaamin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksista (Laihanen ym. 1996). Kuitenkin edellä kuvatun herkkyysanalyysin perusteella tällä tekijällä ei pitäisi olla vaikutusta tutkittujen alpratsolaami-formulaatioiden kohdalla.

Kummankin lääkevalmisteen apuaineet vastasivat suurelta osin toisiaan, mutta Xanor sisälsi dokusaattinatriumia, mikä on laksatiivinen aine, joka saattaisi nopeuttaa valmisteen tyhjenemistä mahasta, jolloin t_{\max} aikaistuu ja C_{\max} saattaa kasvaa. Alpratsolaami valmisteiden liukeneminen oli nopeaa, ja lääkeaine permeoituu nopeasti, joten sen imeytymisnopeus saattaisikin olla riippuvaista juuri mahan tyhjenemisnopeudesta. Toisaalta dokusaattinatriumin määrä Xanor-tabletissa on todennäköisesti häviävän pieni aiheuttaakseen laksatiivisia vaikutuksia (tavallisesti käytetään laksatiivina annoksilla 50-200 mg), joten tällä seikalla tuskin on merkitystä *in vivo* BE-tulokseen. Asiaa kuitenkin tutkittiin herkkyysanalyysillä muuttamalla GE-parametrin arvoa. Selvisi, etteivät GE-muutokset vaikuttaneet lainkaan simulaatiokuvaajiin, joten alpratsolaamin tapauksessa pienellä apuaine-erolla tuskin on vaikutusta simulaatioiden erottelukykyyyn. Myöskään valmistetyypin ei pitäisi vaikuttaa alpratsolaamin plasman pitoisuus-aikakuvaajiin, sillä MU/SU-formulaatiosimulaatioita ei esiintynyt minkäänlaista eroavaisuutta.

Edellä mainitut seikat huomioiden voidaan todeta alpratsolaamin formulaatiosimulointien tulokset luotettaviksi ja mallin olevan erottelukykyinen alpratsolaamin lääkevalmisteille. Näin ollen simulaatioiden pohjalta tehdyn päätelmän siitä, ettei BE-riskiä ole, voisi olettaa pitävän paikkansa.

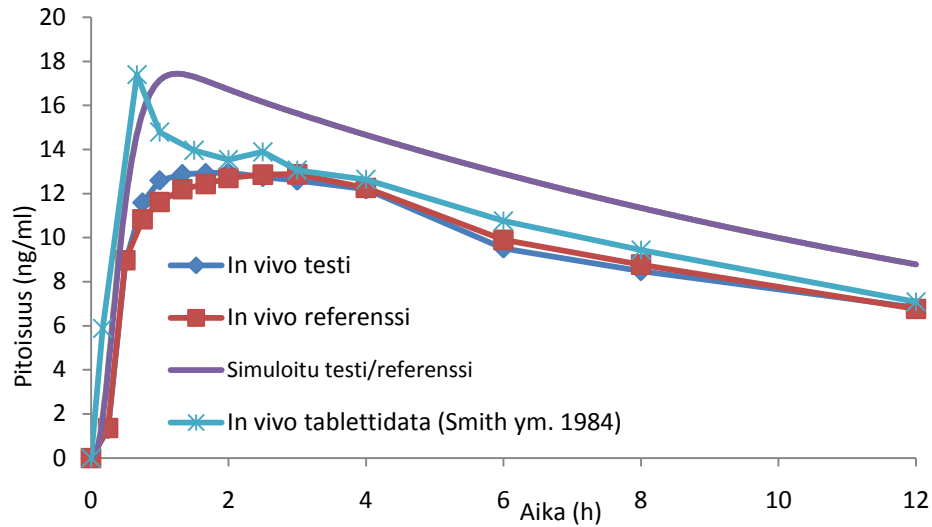
4.2.4 Simulaatioiden vertailu *in vivo* BE-tutkimukseen

Kun laskettiin vanhan BE-kokeen *in vivo* aineistosta alpratsolaami-valmisteiden AUC- ja C_{\max} -parametreille T/R-suhteet, olivat ne annetuissa rajoissa (taulukko 9). Toisin sanoen, myös *in vivo* BE-aineiston perusteella valmisteet olivat bioekvivalentit, mikä vahvisti edellä tehdyn riskiarvion luotettavuuden.

Taulukko 9: Alpratsolaami-valmisteiden *in vivo* BE-tutkimusaineistosta laskettujen BE-parametrien testi/referenssi-suhteet ja suluissa ennustetut suhteet.

BE-parametri	T/R-suhde
C_{\max}	1.01 (0.99)
AUC	0.99 (1.00)

Verrattaessa formulaatiosimuloinneista saatuja kuvaajia BE-kokeen, *in vivo* kuvaajiin havaittiin käyrien olevan hyvin samanmuotoiset, mutta simulaatiokäyrät olivat selvästi korkeammalla tasolla (kuva 7). Tämä saattoi johtua siitä, että simulaatioissa käytetyt alpratsolaamin farmakokineettiset parametrit olivat peräisin keskiarvoaineistosta ja niissä esiintyi pientä epätarkkuutta verrattaessa lähdeaineiston arvoihin, mm. laskettu jakautumistilavuuden (V_1) arvo oli selvästi pienempi (Smith ym. 1984). Kun käytettiin suoraan lähdeartikkelista (Smith ym. 1984) oletettua suurempaa V_1 -arvoa (noin 43.2 L), saatiin simulaatiokuvaajat vastaamaan *in vivo* kuvaajia lähes täydellisesti. Lisäksi K_a -arvo oli peräisin tablettiaineistosta, mihin liittyy enemmän variaatiota verrattuna liuosaineistoon. Kun samaan kuvaajaan laitettiin vertailun vuoksi lähdeartikkelin (Smith ym. 1984) tablettiannon jälkeinen *in vivo* käyrä, se vastasi imeytymisvaiheeltaan paremmin simulaatioita.



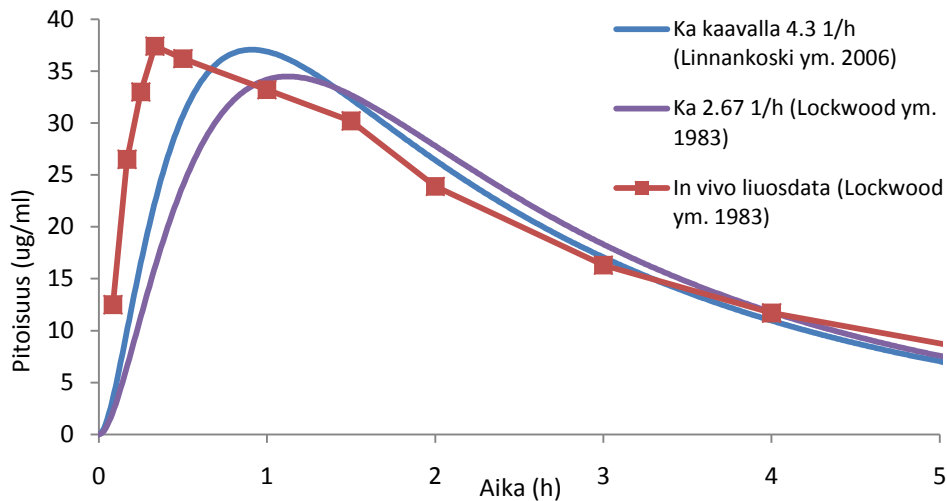
Kuva 7: Alpratsolaamin in vivo BE-kuvaajat vs. simulaatiokuvaajat kummallekin formulaatiolle (Alprox-testivalmiste ja Xanor-referenssivalmiste)

4.3 Ibuprofeeni

4.3.1 K_a -arvon valinta ja liuossimuloinnit

Ibuprofeenin simuloinnit suoritettiin perinteisellä simulaatiomallilla. Liuossimulointien tuloksia verrattiin kirjallisuusaineistoon (eri kuin iv-aineisto), jossa ibuprofeenia oli annettu liuksena 400 mg ja *in vivo* lioskuvaajan pitoisuus-aikapisteet olivat erikseen taulukoituina (Lockwood ym. 1983).

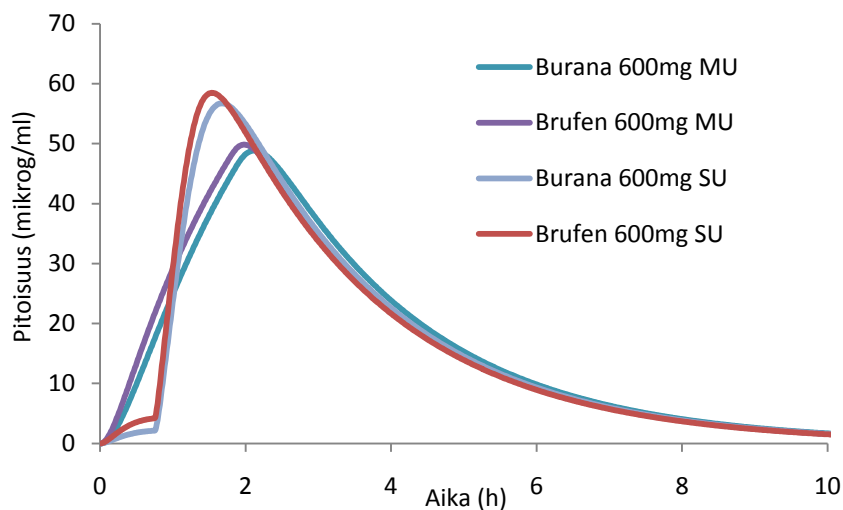
Kaavalla (Linnankoski ym. 2006) laskettu K_a oli 4.3 h^{-1} . Kirjallisuudesta suoraan otettu arvo oli määritetty dekonvoluutiolla ja lähes puolet pienempi edelliseen verrattuna, eli 2.67 h^{-1} (Linnankoski ym. 2006; Lockwood ym. 1983). Kaavalla määritetty K_a vastasi paremmin *in vivo* lioskuvaajaa, ja valittiin ibuprofeenille jatkosimulointeja varten (kuva 8). Kirjallisuuden lioskuvaaja erosi jonkun verran simuloituista luultavasti siksi, että kaikki käytetty aineisto oli keskiarvoaineistoa (kuva 8). *In vivo* lioskuvaajan imeytymisvaihe on selvästi kahta muuta nopeampaa.



Kuva 8: Ibuprofeenin liuosmuotojen simuloinnit eri K_d -arvoilla ja vertailu in vivo liuoskuvaajaan.

4.3.2 Formulaatiosimuloinnit

Formulaatiosimulaatioiden kuvaajissa ei ollut havaittavissa merkittävää eroa valmisteiden (Orionin Burana 400/600mg ja Abbottin Brufen 400/600mg) välillä, koska liukenemiskokeet oli tehty ainoastaan yhdessä väliaineessa (pH 7.2), jossa kaikkien valmisteiden liukeneminen oli hyvin nopeaa. Myöskään vahvuuksien välillä kuvaajissa ei esiintynyt eroa. Valmistetyypin (MU/SU) havaittiin kuitenkin vaikuttavan selvästi valmisteiden simulaatioprofiileihin (kuva 9).



Kuva 9: Ibuprofeeni 600mg formulaatioiden simulaatiokuvaajat.

4.3.3 BE-riskiarvio

Tutkittujen ibuprofeeni-valmisteiden valmistustyyppistä (MU/SU) ei ollut täyttä varmuutta, ja lisäksi niiden apuaineissa esiintyi eroavaisuuksia. Nämä tekijät saattavat vaikuttaa valmisteiden liukenemiseen ja dispergoitumiseen, ja edelleen mahan tyhjenemiseen. Simuloiduista kuvaajista havaittiin GE-parametrin olevan merkittävä tekijä formulaatioiden erottelun kannalta, koska MU vs. SU kuvaajissa oli havaittavissa selkeä ero (kuva 9). Valmistetyypin selvittämiseksi valmisteille tehtiin hajoamiskoe dekanteri-lasissa. Kokeessa seurattiin valmisteiden hajoamista 250 ml:ssä puskuriliuosta (37 °C), kahdessa eri pH:ssa, 1.2 ja 7.2. Havaittiin, että kaikki tutkitut valmisteet olivat MU-formulaatioita ja ne dispergoituivat hyvin jo pH:ssa 1.2. Dispergoitusnopeuksissa oli kuitenkin hieman eroja, Burana 600mg ollessa selvästi hitain kummassakin pH:ssa (39 min pH 1.2 ja 27 min pH 7.2). Muut valmisteet dispergoituivat ≤ 13 minuutissa molemissa pH:issa.

Ibuprofeenin MU-formulaatioiden simulaatiotuloksista määritettiin BE-parametrit C_{max} ja AUC ja niille testi/referenssi-suhteet (taulukko 10). T/R-suhteelle annettujen kriteerien pohjalta (kappale 3.2.7) valmisteet näyttivät olevan simulaatioissa bioekvivalentit ja niiden perusteella riskiä in vivo BE-tutkimuksessa epäonnistumiseen ei olisi. Seuraavassa tarkastellaan muita ibuprofeenin BE-riskiarvioon ja mahdollisesti sen luotettavuuteen vaikuttavia tekijöitä.

Taulukko 10: Ibuprofeeni-valmisteiden simulaatiotuloksista lasketut BE-parametrien ennustetut testi/referenssi-suhteet.

BE- parametri	T/R-suhde (400mg)	T/R-suhde (600mg)
C_{max}	1.01	0.99
AUC	1.00	1.00

Fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksiensa (taulukko 1) takia ibuprofeenin liukoisuus vaihtelee GI-kanavassa alueittain, pH:n mukaan. Se on niukkaliukoinen happamassa ympäristössä (maha), mutta pH:n noustessa (suoli) liukoisuus hieman paranee. Simulaatioissa jouduttiin kuitenkin käyttämään samaa liukenemisen nopeusvakion

arvoa mahassa ja suolessa (pH 7.2), eikä malli siten kuvannut ibuprofeenin liukenemistä mahassa *in vivo* (selvästi liian suuri). Myös ibuprofeenin BCS-monografiassa on esitetty, että hyvin usein ibuprofeenin imeytymisessä ja sen valmisteiden bioekvivalenssin saavuttamisessa ongelmaksi saattaa tulla BCS luokituksesta (II) johtuen liukeneminen ja liukoisuus, joten ibuprofeenin tapauksessa olisi tärkeää nähdä liukenemisen kuvaajat eri pH-tasoilla (EMA BE-ohjeisto 2010; Potthast ym. 2005). Tällä tekijällä saattaisi siis olla vaikutusta mallin erottelukykyyhin.

Ibuprofeenin IR-valmisteet eivät välttämättä ole bioekvivalentteja keskenään, sillä jos liukoisuuden tai liukenemisen helpottamiseksi/parantamiseksi formulaatiossa tarvitaan esim. pH:ta sääteleviä apuaineita ja surfaktantteja, ne saattavat nopeuttaa toisen valmisteen ibuprofeenin imeytymistä (Potthast ym. 2005). Apuaineiden vaikutus formulaatioiden eroihin liukoisuudessa ja liukenemisessä (lääkeaineen vapautumisnopeudessa) voidaan kuitenkin useimmissa tapauksissa havaita vertailevilla liukenemiskokeilla (*in vitro*). Näin ollen simulaatioissa ko. formulaatioerot tulevat huomioiduiksi K_d -arvossa. Koska vertailevaa aineistoa *in vitro* liukenemisestä ei ollut käytössä, apuaineiden vaikutusta mallin erotuskykyyn ei voitu suoraan pois sulkea.

Ruuan tunnetaan vaikuttavan ibuprofeenin imeytymisnopeuteen todennäköisesti nostamalla mahan pH-arvoa, mikä saattaa johtaa ibuprofeenin aikaisempaan *in vivo* vapautumiseen valmisteesta (Levine ym. 1992). Tästä voisi päätellä, että myös mahdolliset yksilön sisäiset erot mahan pH:ssa tai, kuten edellä todettiin, tiettyjen apuaineiden vaikutus mahan pH-arvoon saattaisivat vaikuttaa eroihin lääkevalmisteiden BE-parametreissa. Tätä seikkaa ei erikseen huomioitu simulaatiomallissa.

Näistä epävarmuustekijöistä johtuen teoreettisilla simulaatiokokeiluilla haluttiin edelleen selvittää, kuinka suuri merkitys liukenemisen nopeusvakioilla saattaisi olla ibuprofeenin BE-riskiarvion luotettavuuden kannalta, eli kuinka suuri vaikutus (haitta) sillä oli tuloksiin, että käytössä olivat tuloksia liukenemisestä ainoastaan yhdessä, eikä kovin erottelevassa, väliaineessa. Nämä herkkyysanalyysit suoritettiin, sekä mahan, että suolen K_d -arvoille.

Havaittiin, että K_d -arvon muuttaminen mahassa/suolessa vaikutti simulaatiokuvaajiin ainoastaan tiettyyn raja-arvoon asti, jonka jälkeen muutoksen kasvattaminen suuntaan tai toiseen ei enää vaikuttanut tulokseen. Lisäksi parametreista C_{max} oli selvästi AUC:tä herkempi K_d -arvon muutoksille. Koska ibuprofeeni on mahassa hyvin niukkaliukoinen, K_d -arvo mahassa ei selvästikään ollut yhtä kriittinen parametri, kuin K_d suolessa. Mahassa edes K_d -arvon voimakas pienentäminen ei vaikuttanut juuri lainkaan kummankaan vahvuuden simulaatioprofiileihin. Tämä johtui siitä, että koska arvo oli jo valmiiksi hyvin pieni, oltiin jo kriittisen rajan alapuolella. Näin ollen ainoastaan K_d :n selvä suurentaminen (7-kertainen alkuperäiseen nähden) vaikutti simulaatiokuvaajiin kasvattamalla C_{max} -arvoa yli sallitun T/R-suhteen (0.10). Tämä näkyi kuitenkin ainoastaan 600mg vahvuuden kohdalla, jonka K_d oli alhaisempi verrattuna 400mg vastaavaan arvoon. Sen sijaan suolessa K_d -arvon selvä pienentäminen (noin $\frac{1}{10}$ -osa alkuperäisestä) laski C_{max} :in T/R-suhteen BE-rajojen alapuolelle ja kasvatti T_{max} molemmilla vahvuuksilla. Koska K_d -arvo suolessa oli jo valmiiksi kohtuullisen suuri molemmilla vahvuuksilla, sen kasvattaminen ei vaikuttanut simulaatioprofiileihin. Näin ollen, K_d -arvon puuttuminen fysiologisesti relevanteissa pH-tasoissa, ei välttämättä vaikuttanut mallin erottelukykyyn.

Simulaatioprofiileissa nähtiin merkittävää eroa MU/SU-formulaatioiden välillä (kuva 11). Lisäksi hajoamiskoe antoi viitteitä siitä, että valmisteet sisälsivät apuaineita, jotka vaikuttivat niiden erilaiseen hajoamisnopeuteen, Burana 600 mg ollessa hitain. Tämä saattoi johtua siitä, että Burana 600mg formulaatiossa ei ollut esigelatinoitua tärkkelystä, kuten Burana 400mg, tai natriumlauryylisulfaattia, kuten Brufen 400/600mg, eikä mitään vastaavanlaisia hajoamista edistäviä apuaineita. Sen sijaan Burana 600mg sisälsi, 400mg-formulaatiosta ja Brufeneista poiketen, liivatetta ja makrogoli 6000, mitkä sideaineina eivät juuri nopeuta tai edesauta tabletin hajoamista. Ne saattavat sen sijaan jopa lisätä sen mekaanista lujuttua.

Ibuprofeeni-valmisteiden herkkyttä GE-arvon muutoksille tutkittiin herkkyysanalyysillä. Havaittiin, että mahan tyhjenemisen pienikin hidastaminen, tai kasvatus (GEx0.5 molemmat vahvuudet, 400mg GEx1.5 ja 600mg GEx2) vaikutti C_{max} -parametrin T/R-suhteeseen (ei enää sallituissa rajoissa). Näin ollen ibuprofeeni on

herkkä mahan tyhjenemisnopeuden muutoksilla, jolloin myös valmistetyypillä on selkeä vaikutus ibuprofeenin konsentraatioon imeytymispaikalla. Erot valmistetyypissä voivat aiheuttaa vaihtelua C_{\max} -arvoihin valmisteiden välillä, ja edelleen BE-riskiä.

Ilman hajoamiskoetta (tietoa hajoamistavasta/valmistetyypistä) olisi voinut olettaa, että ibuprofeenin tapauksessa BE-riski (simulaatiotuloksesta huolimatta) olisi olemassa, koska valmisteiden mahantyhjenemisestä ei ollut varmuutta. Lisäksi aineistoa liukenemisestä alhaisessa pH:ssa puuttui, vaikka ibuprofeenin fysikaaliskemialliset ominaisuudet huomioiden (taulukko 1) juuri sen olisi voinut olettaa olevan kriittistä. Kuitenkin, hajoamiskokeen vahvistamien tietojen valossa, yhdessä muun edellä kuvatun pohdinnan kanssa, riskin voisi olettaa olevan vain pieni ja mallin antavan melko luotettavan arvion näiden valmisteiden tapauksessa.

4.3.4 Simulaatioiden vertailu *in vivo* BE-tutkimukseen

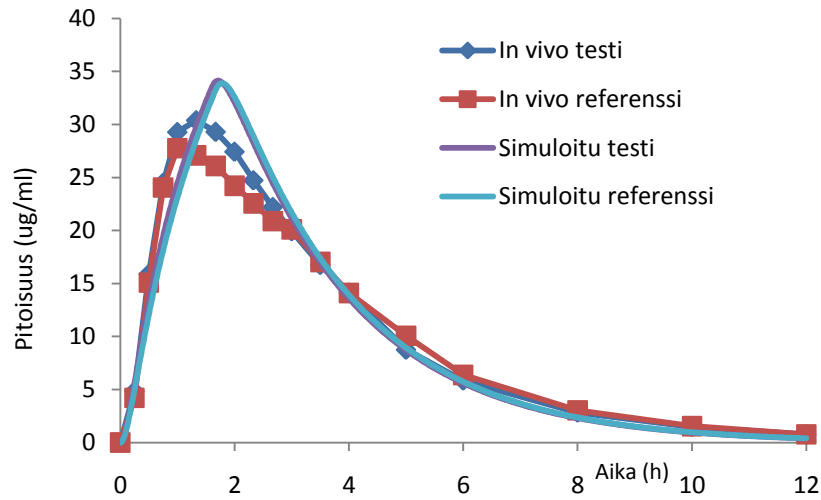
Kun laskettiin ibuprofeeni-valmisteille *in vivo* BE-aineistosta BE-parametrit ja niille testi/referenssi-suhteet, myös ne olivat annetuissa rajoissa, eli valmisteet olivat tämän perusteella bioekvivalentit (taulukko 11), mikä vahvisti edellä tehdyn riskiarvion.

Taulukko 11: Ibuprofeeni-valmisteiden *in vivo* BE-tutkimusaineistosta lasketut BE-parametrien testi/referenssi-suhteet ja suluissa ennustetut suhteet.

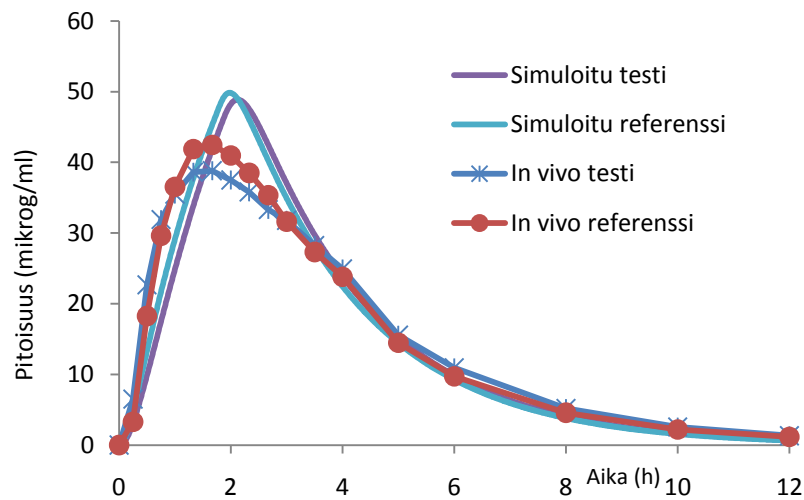
BE-parametri	T/R-suhde (400 mg)	T/R-suhde (600 mg)
C_{max}	1.08 (1.01)	0.91 (0.99)
AUC	1.01 (1.00)	1.02 (1.00)

Kaikkien ibuprofeeni-valmisteiden simulaatiokuvaajat erosivat jonkun verran *in vivo* BE-tutkimusten profiileista (kuvat 10 ja 11) ollen mm. hieman korkeammalla tasolla. Lisäksi T_{\max} oli simulaatiokuvaajissa myöhäisempi. Tätä eroavaisuutta saattoi aiheuttaa se, että simulaation parametrit olivat peräisin keskiarvoaineistosta, ja toisaalta simulaatioprofiileja verrattiin *in vivo* keskiarvokuvaajiin. Lisäksi *in vivo*-tilanteessa lääkevalmisteiden kostuminen ja dispergoituminen mahassa saattaa alkaa tehokkaammin ja olla voimakkaampaa, kuin mitä simulaatiossa kyetään liukenemiskokeiden

perusteella kuvaamaan, ja tästä syystä t_{max} on varhaisempi ja imeytymisvaihe jyrkempi (kuvat 10 ja 11).



Kuva 10: Ibuprofeenin 400mg -valmisteiden simulaatio vs. *in vivo* pitoisuus-aikakuvaajat.



Kuva 11: Ibuprofeeni 600mg -valmisteiden simulaatio vs. *in vivo* pitoisuus-aikakuvaajat.

4.4 Varfariini

4.4.1 K_a -arvon valinta ja liuossimuloinnit

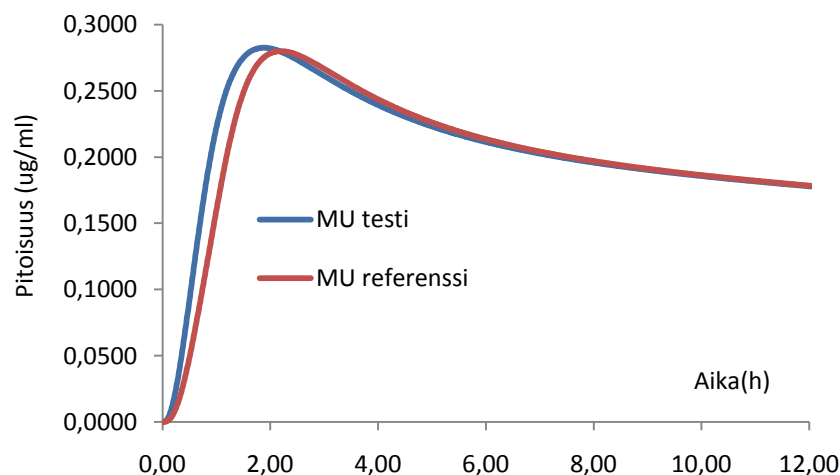
Kirjallisuudessa mainitaan, että antoreitti ei vaikuta varfariinin imeytymiseen, ja että se imeytyy täydellisesti eri-tyyppisistä formulaatioista (O'Reilly ym. 1964). Verrattuna muihin valmistemuotoihin liuoksena annosteltuna varfariinin T_{max} aikaistuu, mutta C_{max}

ei muutu (O'Reilly ym. 1964). Näistä syistä sopivan *in vivo* liuosaineiston puuttuessa voitiinkin katsoa oikeutetuksi käyttää IR-tablettien annostelun jälkeistä aineistoa (*in vivo*) vertailupohjana varfariinin imeytymisen nopeusvakion arvon valinnassa. Varfariinin *in vivo* tablettiaineisto oli peräisin tutkimuksesta, jossa varfariinin annos vaihteli eri henkilöillä painon mukaan, eli 0,5 mg/kg (Breckenridge ja Orme 1973).

Kirjallisuudessa esitettiin imeytymisen nopeusvakion arvoksi 2.96 h^{-1} (Breckenridge and Orme 1973), mikä vastasi laskukaavalla (Linnankoski ym. 2006) saatua, ja näin ollen simulaatioissa käytettyä K_a -arvoa (2.30 h^{-1}).

4.4.2 Formulaatiosimuloinnit

Formulaatiosimulaatiot suoritettiin teoreettisillä K_d -arvoilla. Simulaatioissa valmisteita ei saatu eroteltua juuri lainkaan, vaikka niiden liukeneminen oli selkeästi erilaista alhaisissa pH-tasoissa (kuva 12). Simulaatiokuvaajista (kuva 12) havaittiin, että Coumadiinilla C_{\max} oli hieman alhaisempi, mutta T_{\max} -arvoissa oli selkeää viivästymistä verrattuna Marevaaniin. Varfariinin kohdalla formulaatiotyyppi (MU/SU) ei vaikuttanut lainkaan simulaatiokuvaajiin.



Kuva 12: Varfariinin formulaatiosimuloinnit, joissa farmakokineettiset parametrit peräsin ainoastaan henkilön 4 aineistosta.

4.4.3 BE-riskiarvio

Varfariinin simulaatiotuloksista määritettiin C_{\max} ja AUC ja niiden arvoille laskettiin testi/referenssi-suhteet (taulukko 12). T/R-suhteelle annettujen kriteerien pohjalta (kappale 3.2.7) valmisteet näyttivät olevan simulaatioissa bioekvivalentit ja niiden perusteella riski *in vivo* BE-tutkimuksessa epäonnistumiseen olisi pieni. Seuraavassa tarkastellaan muita varfariinin BE-riskiarvion ja sen luotettavuuteen vaikuttavia tekijöitä.

Taulukko 12: Varfariini-valmisteiden simulaatiotuloksista lasketut BE-parametrien ennustetut testi/referenssi-suhteet.

BE-parametri	T/R-suhde
C_{\max}	1.00
AUC	1.01

Vaikka erot varfariini-valmisteiden liukenemisessä alhaisissa pH-tasoissa olivat merkittävät, siltikään sen vaikutus ei näkynyt simulaatiotuloksissa. Lisäksi Coumadiinille lasketut ja simulaatioissa käytetyt K_d -arvot pH:ssa 1.2 ja 4.5 eivät välttämättä olleet edelleenkaan luotettavia, koska määrittäminen perustui karkeaan arvioon, joka tehtiin ainoastaan eksperimentaalisen liukenemisaineiston muutamasta ensimmäisestä, lineaarisen linjan muodostavasta, aikapisteestä.

Suuret erot Marevanin ja Coumadiinin liukenemisessä saattoi johtua erilaisesta valmistustyyppistä ja/tai erilaisista apuainekoostumuksista. Näiden tekijöiden on tutkittu vaikuttavan oleellisesti varfariini-valmisteiden hajoamiseen, ja lääkeaineen vapautumiseen valmisteesta, sekä liukenemiseen ja liukoisuuteen (Smolen and Erb 1977). Tutkitut Marevan ja Coumadiini olivat molemmat hyvin yksinkertaisia formulaatioita ja sisälsivät vähän apuaineita. Konkreettisin ero niissä oli siinä, että Marevan sisälsi maissitärkkelyksen ja laktoosi monohydraatin seoksen, minkä on tutkittu aiheuttavan, paitsi sitä sisältävän valmisteiden nopean hajoamisen (riippumatta tabletin huokoisuudesta), mutta myös lääkeaineen nopean liukenemisen. Coumadiini puolestaan sisälsi laktoosia ja tärkkelystä. Tärkkelyksestä tiedetään, että siinä kosteuden

epätasainen jakautuminen voi hidastaa lääkevalmisteen liukenemistä. *In vivo* tilanteessa nopeasti valmistesta vapautunut lääkeaine ja/tai pieniksi partikkeleiksi hajonnut valmiste pääsisi Marevanin tapauksessa aikaisemmin kulkeutumaan suoleen, millä saattaa olla merkittävää vaikutusta varfariinin imeytymisen varhaisiin vaiheisiin ja toisaalta Marevan ja Coumadin-valmisteiden BE-eroihin. Lisäksi on huomioitava jo aikaisemminkin mainittu seikka siitä, että *in vitro* liukenemiskokeissa ja *in vivo* BE-kokeissa Marevanin kodalla käytettiin kahta 1mg tablettia. Näin ollen sen suurempi pinta-ala verrattuna Coumadiiniin (yksi 2mg tabletti), oli mahdollisesti tärkein syy siihen, miksi sen liukeneminen ja lääkeaineen kulkeutuminen imeytymispaikalle oli tehokkaampaa.

Jotta saatiin parempia arvioita liukenemisen ja Kd-arvojen merkityksestä mallin erottelukykyyn varfariinin tapauksessa, myös sille tehtiin teoreettinen liukenemisen nopeusvakion herkkysanalyysi vaihdellen referenssivalmisteen Kd-arvoa mahassa/suolessa. Havaittiin, että mahan Kd-arvo ei ollut lainkaan herkkä muutoksille. Suolessa sen sijaan Kd-arvon pienentäminen tiettyyn raja-arvoon asti ja siitä edelleen (raja arvo oli $\frac{1}{5}$ -osa alkuperäisestä Kd-arvosta) vaikutti Cmax-arvoon, jolloin Cmax:in T/R-suhde laski alle sallittujen rajojen. Suolessa Kd-arvon merkittäväkään kasvattaminen ei puolestaan vaikuttanut lainkaan simulaatioprofiileihin. Tämän perusteella pelkkä Kd-arvojen poikkeavuus ei siis voinut olla ratkaisevassa osassa varfariini-formulaatioiden erottelussa.

Fysikaaliskemiallisten ominaisuuksiensa takia varfariinin voisi olettaa olevan herkkä mahan tyhjenemisnopeuden vaihteluille (kuten ibuprofeenin) ja tämän tekijän mahdollisesti vaikuttavan varfariini-valmisteiden erotteluun simulaatiomallilla. On kuitenkin otettava huomioon aikaisempi huomio siitä, että simulaatiomallin perusteella varfariinin kohdalla ei ollut merkitystä, oliko valmiste moni- vai yksi-yksikkövalmiste. Lisäksi, kun tutkittiin herkkyyksanalyysin avulla GE-parametrissa esiintyvien muutosten vaikutusta varfariini-valmisteiden T/R-suhteeseen, havaittiin, ettei kyseinen parametri ollut kovinkaan herkkä muutoksille. Vasta hyvin suuret erot mahan tyhjenemisnopeudessa toivat merkitsevää eroa Cmax:in T/R-suhteeseen.

Vastaavanlaiset, merkittävät, mahan tyhjenemisnopeuden muutokset eivät kuitenkaan ole mahdollisia *in vivo*.

Varfariinin on tutkittu imeytyvän nopeasti ja lähes täydellisesti mahasta ja GI-kanavan alkupäästä (O'Reilly ym. 1963). Lisäksi se on heikko happo, jonka pKa on 5.08 (Stella ym. 1984). Tähän liittyen käytetyssä simulaatiomallissa ohutsuolen alkuosaa ei kuitenkaan määritetty fysiologisesti täysin oikein, sillä on todettu, että suolen 1.-2. yksikössä pH on todellisuudessa noin 4 (Sutton 2009), eikä 6.8 koko ohutsuolen matkalta, kuten simulaatioissa oli oletettu. Tällä saattaisi olla vaikutusta mallin kykyyn erotella varfariini-formulaatiot, sillä Coumadiinin eksperimentaalinen *in vitro* liukeneminen oli erittäin huonoa myös pH:ssa 4.5, kun taas Marevanilla liukeneminen ko. pH:ssa oli erittäin hyvää. Asian tutkimiseksi tehtiin lisäsimulointeja, joissa pH:n oletettiin olevan 4.5 ohutsuolen 1. ja 2. yksikössä, jolloin lääkeaineen ominaisliukoisuus ja valmisteen Kd vaihdettiin vastaamaan ko. pH:ta. Lopuissa yksiköissä, 4.-7., parametrit säilytettiin ennallaan. Simulaatiotuloksista päätellen tällä oli vaikutusta Coumadiinin C_{max}-arvoon, joka odotetusti laski. Muutos ei kuitenkaan laskenut parametrin T/R-suhdetta annettujen rajojen ulkopuolelle. On kuitenkin huomioida, että kyseisiä simulaatioita varten ei ollut saatavilla varfariinin liukoisuusaineistoa pH:ssa 4.5. Koska tiedettiin, että sen liukoisuus pH:ssa 7 ja pH:ssa 1.2, liukoisuuden pH:ssa 4.5 arvioitiin keskiarvo tältä väliltä (12.5 ug/ml). Todellisuudessa arvo saatta olla pienempi, jolloin mallissa tehty fysiologinen muutos saattaisi vaikuttaa merkittävästi C_{max}:in T/R-suhteeseen.

Myöskään varfariinin mahdollista mahasta imeytymistä ei huomioitu simulaatiomallissa. Kuten parasetamolien kohdalla, mahasta imeytyminen on yhteydessä valmisteiden mahdollisiin hajoamisen/liukenemisen eroihin alhaisessa pH:ssa. Asian tutkimiseksi varfariinille suoritettiin samantyylliset simuloinnit kuin parasetamolille. Simulaatiokuvaajiin saatiin aikaan terävä huippu, jollainen esiintyi myös lähdeartikkelissa esitettyssä tablettien annon jälkeisissä (*in vivo*) kuvaajissa (Breckenridge and Orme 1973), mutta mahasta imeytymisen lisäys ei kuitenkaan tuonut merkittävää eroa BE-parametrien T/R-suhteisiin.

Varfariinin farmakokinetiikassa ja farmakodynamiikassa on havaittu kirjallisuudessa laajaa yksilöiden välistä ja erityisesti sisäistä vaihtelua (O'Reilly ym. 1966). Varfariinin imeytymiserojen (*in vivo* ihmisillä) on tutkittu johtuvan tekijöistä, jotka liittyvät mm. imeytymisen viivästymiseen (lag time), imeytymisen nopeusvakioon tai imeytymisen kinetiikkaan (O'Reilly ym. 1966). Näiden on epäilty johtuvan mm. vaihtelevista mahan tyhjenemisajoista ja mahanesteiden pH:n muutoksista. Lisäksi, jos varfariini annostellaan natriumsuolana, se saattaa saostua GI-kanavassa (johtuu happaman varfariinin ionisaatiosta pKa:ta suuremmissa pH-tasoissa), ja aiheuttaa epäsäännöllisen ja vaihtelevan imeytymiskäyttäytymisen (Okimoto ym. 1996). Molemmat tutkituista formulaatioista sisälsivät varfariinia, joka oli ko. suolamuodossa. Kaikki mainitut variaatiota aiheuttavat tekijät voivat omalta osaltaan vaikuttaa BE-tutkimusten tuloksiin ja koska niitä ei ole kokonaisvaltaisesti pystytty huomioimaan käytetyssä simulaatiomallissa, se ei myöskään välttämättä kykene erottelemaan varfariini formulaatioita täysin luotettavasti toisistaan ja antamaan luotettavaa BE-riskiarviota.

Kokonaisuudessaan edeltävään pohdintaan perustuen formulaatiosimulaatioista saatu tulos siitä, että valmisteet olisivat bioekvivalentit, on vähintäänkin epäilyttävä. Varfariinin kohdalla moni seikka jäi avoimeksi, joten ilman lisäaineistoa, voisi olettaa riskin BE-tutkimuksessa epäonnistumiseen olevan melko suuri. Varfariinin kohdalla samantyylinen formulaatioiden hajoamiskoe, kuten ibuprofeeni-valmisteiden tapauksessa, olisi saattanut antaa selkeyttävää lisäinformaatiota. Tarvittavien tabletti-formulaatioiden puuttuessa sitä ei kuitenkaan voitu suorittaa. Myös kirjallisuudessa on esitetty tutkimuksia, joissa varfariini-valmisteiden eroja *in vivo* biologisessa hyötyosuudessa ei kyetty ennustamaan *in vitro* liukenemisaineiston perusteella (O'Reilly ym. 1966; Smolen ja Erb 1977).

4.4.4 Simulaatioiden vertailu *in vivo* BE-tutkimukseen

Kun laskettiin varfariini-valmisteille *in vivo* BE-tutkimusaineistosta BE-parametrit ja niille testi/referenssi-suhteet, ne olivat molempien parametrien kohdalla yli sallittujen rajojen, eivätkä valmisteet olleet bioekvivalentit (taulukko 13). Tämä vahvistaa edellä tehdyn BE-riskiarvion oikeaksi.

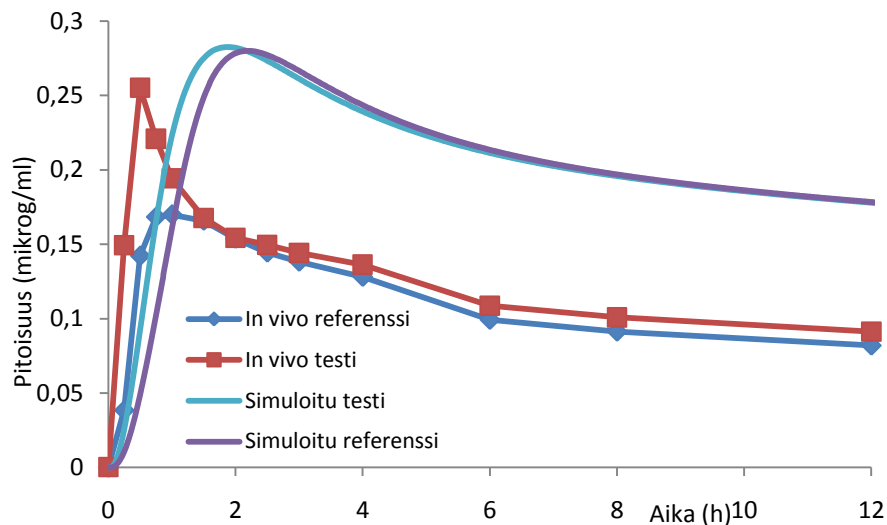
Taulukko 13: Varfariini-valmisteiden *in vivo* BE-tutkimusaineistosta lasketut BE-parametrien test/referenssi-suhteet ja suluissa ennustetut suhteet.

BE-parametri	T/R-suhde
C _{max}	1.52 (1.00)
AUC	1.16 (1.01)

Varrattaessa simuloituja kuvaajia *in vivo* vastaaviin, kuvasta 13 nähdään niiden eroavan selkeästi toisistaan. Myös valmisteiden *in vivo* kuvaajat keskenään olivat hyvin erilaiset.

Sytä simuloitujen vs. *in vivo* kuvaajien eroihin voi olla useita. Marevanin *in vivo* pitoisuuskuvaajissa imeytyminen alkaa aikaisemmin ja on nopeampaa, kuin muissa kuvaajissa. Tämä saattoi johtua siitä, että *in vivo* BE-tutkimuksessa Marevania annettiin tutkittaville kaksi 1mg tablettia, kun taas Coumadiinia yksi 2 mg tabletti. Testivalmisteella oli näin ollen suurempi pinta-ala, jolloin sen *in vivo* dispergoituminen ja liukeneminen saattoivat olla nopeampia, ja lääkeaine pääsi poistumaan mahasta nopeammin imeytyäkseen. Kaikkia tähän liittyviä vaikutuksia ei pystytty kokonaisvaltaisesti mallintamaan. BE-tutkimuksen *in vivo* aineistossa esiintyi molemmilla valmisteilla erittäin paljon myös vaihtelua, mikä saattoi johtua varfariinin farmakokinetiikassa ja farmakodynamiikassa esiintyvistä laajasta yksilöiden välisestä ja sisäisestä vaihtelusta. Tällä puolestaan saattoi olla vaikutusta valmisteiden keskiarvokuvaajiin. Lisäksi mallin rakentamiseen käytetyssä aineistossa (IV- ja tablettiaineisto, O'Reilly ym. 1971) oli epätarkkuutta aiheuttavia tekijöitä, esim. varfariini annokset olivat suuria ja ne vaihtelivat painon mukaan, K_a-arvo peräisin tablettiaineistosta, ja lisäksi vain yksittäisistä yksilöistä saatu aineistoa voi vääristää kuvaa tilanteesta suuremmassa populaatiossa.

K_a-arvon kasvatus teoreettisissa simulaatioissa sai kuvaajan vastaamaan paremmin *in vivo* kuvaajaa. Imeytymisvaiheen alussa esiintyviin eroihin simuloitu vs. *in vivo* saattoi vaikuttaa myös varfariinin mahdollinen mahasta imeytyminen *in vivo*, ja tätä simulaatiomallissa ei huomioitu. Lisäksi kirjallisuudessa V1 arvoksi on esitetty selvästi suurempia arvoja, kuin mitä simulaatioissa käytettiin (5.7 L). Sen kasvattaminen laski simulaatiokäyrät teoreettisissa simulaatioissa *in vivo* tasolle.



Kuva 13: Warfariinin in vivo BE-kuvaajat vs. simulaatiokuvaajat kummallekin formulaatiolle (Marevan-testivalmiste ja Coumadin-referenssivalmiste).

5 POHDINTA

5.1 Simulaatiomallin ennustuskyvyn arviointi

5.1.1 Formulaatiokohtaisten tekijöiden vaikutus

Tämän työn formulaatiosimulaatioissa lääkevalmisteet erottuivat toisistaan ainoastaan liukenemisen nopeusvakion, eli K_d -arvon ja valmistetyypin (MU/SU) mukaisen mahan tyhjenemisen perusteella. Muut parametrit olivat lääkeainekohtaisia ja fysiologisia, ja siten vakioita testi- ja referenssivalmisteelle.

Kiinteän oraalisin lääkkeen annon jälkeen lääkeaineen imeytymisen kannalta ensimmäisiä kriittisiä tekijöitä ovat hajoaminen, liukeneminen, ja liukoisuus, sillä lääkeaineen on pitänyt ensin vapautua valmisteesta ja liueta voidakseen imeytyä. Näin ollen kokeellinen *in vitro* liukeneminen, ja edelleen K_d -arvo, ovat usein relevantteja ennustamaan lääkevalmisteen toimintakykyä *in vivo* ja näin toimimaan simulaatiomallissa formulaatioita erottelevana parametrina. Kuitenkin, jotta valmisteiden erot näkyisivät simulaatioiden pitoisuus-aikakuvaajissa mahdollisimman

totuudenmukaisesti, kokeellisen liukenemisen aineiston on oltava tarpeeksi erotteleva ja mahdollisimman hyvin *in vivo* tilannetta kuvaava. Tästä syystä liukenemiskokeet tulee suorittaa jokaiselle lääkeaineelle sopivalla menetelmällä, joissa voidaan tarpeen mukaan muuttella mm. pyöritysnopeutta, liukenemisen väliaineita ja pH-tasuja (EMEA BE-ohjeisto 2010 suosittelee pH-tasuja 1.2, 4.5 ja 6.8).

Simulaatiomallin käytössä ja tulosten tarkastelussa on syytä huomioida, mikä tekijä todellisuudessa rajoittaa ko. lääkeaineen imeytymistä. Ei ole samantekevää, onko rajoittava tekijä liukenemisnopeus, vai esim. lääkeaineen saturaatioliukoisuus, tai permeaatio. Esimerkiksi, jos lääkeaineen imeytymistä rajoittaa liukenemisnopeus, imeytyvän lääkeaineen absoluuttisen määrän on mahdollista kasvaa annoksen kasvaessa ja lisäksi partikkelikoon pienentäminen ja lääkeaineen annostelun liuksena pitäisi parantaa imeytymistä. Sen sijaan, jos lääkeaineen imeytymistä rajoittaa sen saturaatioliukoisuus, lääkeaineen absoluuttinen imeytynyt määrä ei kasva annoskoon suurentuessa, eikä liukenemisnopeuden kasvatus lisää sen imeytymistä. Kuitenkin, annoksen ollessa hyvin pieni, liukoisuus ei enää rajoitakaan imeytymistä, vaan tällöin (myös) liukenemisestä voi tulla imeytymistä rajoittava tekijä (alpratsolaami ja varfariini).

Kd-arvon käyttö formulaatioiden erotteluun sopii erityisen hyvin sellaisille lääkeaineille (esim. alpratsolaami, ja teoriassa varfariini), joiden imeytymistä rajoittaa liukeneminen. Emäksiset BCS II lääkeaineet (alpratsolaami) ovat usein tällaisia. Sen sijaan sellaisille lääkeaineille, joiden saturaatioliukoisuus rajoittaa imeytymistä (BCS IV, ja osa BCS II lääkeaineista), Kd-arvon muuttaminen suuntaan tai toiseen, ei juuri lainkaan vaikuta simulaatioprofiileihin. Tällöin liukenemisella (pelkän Kd-arvon perusteella) ei saada eroa aikaiseksi, eikä mallilla saatua tulosta voida pitää absoluuttisena oikeana vastauksena, jolloin muiden BE-riskiin vaikuttavien tekijöiden rooli korostuu.

Usein tapauskohtaista harkintaa vaativa ryhmä ovat happamat, niukkaliukoiset, BCS II-luokan lääkeaineet (esim. ibuprofeeni). Ne ovat niukkaliukoisia happamassa mahassa ja paremmin liukenevia suolen korkeammassa pH:ssa. Siten saturaatioliukoisuus on nopeutta rajoittava tekijä mahassa, eikä mahan Kd arvolla ole juuri vaikutusta

simulaatioprofiileihin. Sen sijaan imeytyminen ohutsuolessa riippuu liukenemisnopeudesta, jolloin tässä pH:ssa määritetyt Kd-arvot kuvaavat luotettavammin formulaation toimintakykyä suolessa *in vivo*. Näin ollen, näiden lääkeaineiden kohdalla mallilla voidaan teoriassa ennustaa mahdolliset formulaatioerot ja BE-riski. Kuitenkin, hyvin usein saturaatioliukoisuus ja valmisteiden Kd-arvo kasvavat suolessa niin korkeiksi, ettei kumpikaan enää ole imeytymistä rajoittava tekijä, vaan niitä tärkeämmäksi BE-riskiarviossa nousevat erot lääkevalmisteiden mahasta tyhjenemisessä, mikä vaikuttaa siihen, kuinka nopeasti ja voimakkaasti liukeneminen ja imeytyminen ohutsuolessa voi alkaa. Mahan tyhjenemiseen liittyy läheisesti erot valmisteiden hajoamisessa mahan happamassa pH:ssa, mikä voi johtua valmisteiden apuaineista tai valmistusmenetelmistä.

Tämän työn simulaatiomallissa mahan tyhjeneminen eri formulaatiotyypeille (MU/SU) olikin toinen tekijä, mikä erotteli valmisteita simulaatioissa. Jos happamien BCS II luokan lääkeaineiden valmisteiden formulaatiotyyppi ei ole tiedossa, on vaikea antaa luotettavaa arviota niiden BE-riskistä. Lisäksi formulaatiosimuloinnin tuloksien luotettavuutta hämärtää, jos toinen valmisteista sisältää sellaista apuainetta, joka vaikuttaa mahan tyhjenemisnopeuteen (esim. ksylitoli, sorbitoli, mannitoli), sillä tätä seikkaa ei mallissa pystytä kokonaisvaltaisesti huomioimaan. Simulaatiomallilla tehdyillä herkkyysanalyysillä kyettiin kuitenkin selvittämään, onko ko. lääkeaine herkkä mahan tyhjenemisen nopeusvaihteluille, eli näkyikö GE-arvon muutokset selkeästi simulaatioprofiileissa ja BE-parametreissa. Jos, lääkeaine vaikuttaa olevan herkkä mahan tyhjenemiselle, tarvitaan lisätietoa valmisteiden apuaine-eroista ja valmistetyypistä.

BSC luokan I ja III lääkeaineiden kohdalla liukoisuus on hyvää, ja näin ollen Kd-arvoissa esiintyvät selkeät erot näkyvät simulaatioprofiileissa ja malli kykenee erottelemaan formulaatiot toisistaan ja ennustamaan BE-riskiä. Kuitenkin tavanomaisia apuaineita käytettäessä näiden lääkeaineiden kohdalla liukeneminen on harvoin nopeutta rajoittava tekijä imeytymisessä, koska se on usein hyvin nopeaa sekä mahassa, että suolessa. Sen sijaan mahasta tyhjeneminen (BCS I) ja permeatio (BSC III) ovat kriittisiä tekijöitä.

Kuten happamien BCS II lääkeaineiden kohdalla, myös BCS luokan I ja III lääkeaineiden tapauksessa, simulaatiomallin erottelukyvyn kannalta olisi hyvä tietää valmisteiden valmistustekniikka, hajoamistapa, ja onko formulaatioissa käytetty mahan tyhjenemisenopeuteen vaikuttavia apuaineita. BCS III lääkeaineiden tapauksessa on myös tärkeää selvittää, vaikuttavatko jommankumman valmisteiden apuaineet lääkeaineen permeaatioon. On nimittäin tutkittu, että apuaineet voivat vaikuttaa lääkeaineen imeytymiseen ja kulkeutumismekanismeihin GI-kanavassa. Tietyt apuaineet saattavat avata solukalvon tiiviitä liitoksia ja kasvattaa parasellulaarisesti kulkeutuvien lääkeaineiden imeytymistä (parasetamoli) (Aungst 2000; Rege ym. 2001). Kuitenkin tavallisimmin käytetyillä apuaineilla ei ole tutkitust esiintynyt tällaisia ominaisuuksia, kun niiden vaikutuksia lääkeaineiden permeaatioon on tutkittu *in vitro* Caco-2 soluilla (Rege ym. 2001). Lisäksi tiettyjen lääkeaineiden huonon imeytymisen syynä saattaa olla aktiivinen efflux suolessa, ja koska jotkut apuaineet voivat olla efflux-proteiinien substraatteja tai inhibiittoreita, ne saattavat edistää/rajoittaa kyseisen lääkeaineen imeytymistä. Tämä seikka liittyy kaikkien BCS-luokkien lääkeaineisiin.

Jotkut apuaineet saattavat vaikuttaa myös ohutsuolessa kulkeutumisen kokonaisuikaan. Joissain tutkimuksissa on osoitettu, että osmoottisesti aktiiviset apuaineet (esim. natriumhappo pyrofosfaatti ja PEG 400) suurina pitoisuuksina saattavat pienentää lääkeaineen kulkeutumisaikaa ohutsuolessa (kasvattamalla nesteen määrää suolessa) ja vähentää näin imeytyneen lääkeaineen määrää, eli biologista hyötyosuutta (Koch ym, 1993; Basit ym. 2002; Schulze ym. 2003). Tämä seikka on erityisen kriittinen BCS luokan III (parasetamoli) ja IV lääkeaineiden kohdalla, sillä liian lyhyt aika imeytymisalueella vähentää lääkeaineen imeytyntä määrää. Kuitenkin tutkimuksissa ko. apuaineiden määrät olivat melko suuria (1-10 g), eikä sellaisia tavallisesti esiinny IR-valmisteissa.

Formulaatiokohtaisten tekijöiden vaikutuksesta mallin erottelukyvyy, voidaan karkeasti koota, että kokeellisesta *in vitro* liukenemisaineistosta voidaan ennustaa simulaation avulla *in vivo* BE-tuloksia kaikista tarkimmin tilanteessa, jossa *in vitro* testimenetelmä on tarpeeksi erotteleva (tehty mm. eri väliaineissa ja sopivalla

sekoitusnopeudella). Lisäksi on oltava riittävästi tietoa formulaatioista (valmistetyyppi, hajoamistapa, apuaineet jne.). Parhaimmassa tapauksessa tutkituissa lääkeformulaatioissa on sama annos lääkeainetta ja samankaltainen koostumus apuaineita, jotka ovat hyvin tunnettuja. Kun kaikki edellä luetellut kriteerit täyttyvät malli ennustaa parhaiten BE-riskiä BCS-luokan I, ja III lääkeaineille, sekä BCS-luokan II lääkeaineille, kun saturaatioliukoisuus koko fysiologisella pH välillä ei ole imeytymistä rajoittava tekijä.

5.1.2 Mallin oletuksien vaikutus

Siihen, kuinka hyvin simulaatiomalli erottelee valmisteet toisistaan, vaikuttavat myös mallin oletukset. Tämä seikan merkitys ilmeni tässä työssä erityisesti varfariini-valmisteiden kohdalla.

Simulaatiomallissa nesteen tilavuuden ohutsuolessa määritettiin olevan yhteensä 250 ml, jolloin tilavuus jokaisessa ohutsuolen yksikössä oli $\frac{250 \text{ ml}}{7}$. Lisäksi oletettiin, että lääkeainetta imeytyy ainoastaan ohutsuoletta, jokaisesta ohutsuolen yksiköstä yhtä paljon (samalla nopeudella) ja imeytyminen on passiivista sekä lineaarista. Myös pH:n oletettiin olevan sama (6.8) kussakin ohutsuolen yksikössä. Nämä oletukset eivät kuitenkaan pidä fysiologisesti täysin paikkansa. Ensinnäkin todellisuudessa nestetilavuus koko suolessa saattaa olla paasto-olosuhteissa vain 144 ml (Sutton 2009). Lisäksi nestetilavuus sekä pH vaihtelee GI-kanavan eri osissa (taulukko 14). Ohutsuolen duodenumiin ja jejunumiin tiedetään myös kulkeutuvan enemmän nestettä (8-9 L/päivässä), kuin mitä ohutsuolessa pysyvästi on (0.5-1 L/päivä). CAT-mallissa oletetaan, että aika, jonka lääke on jokaisessa ohutsuolen yksikössä (residence time), on samanpituisen. Näin ollen, jotta nämä kaksi tekijää voitaisiin huomioida samanaikaisesti, tilavuuksien, mutta lisäksi myös kulkeutumisenopeuksien tulisi olla simulaatiomallissa suurempia ohutsuolen ensimmäisissä yksiköissä verrattuna jälkimmäisiin. Lisäksi uusimpien tutkimusten valossa ohutsuoli koostuisi kuudesta yksiköstä (taulukko 14) (Sutton 2009; Bolger ym. 2009).

Taulukko 14: Maha-suolikanavan eri yksiköt ja niiden nestetilavuudet.

GI-kanavan yksikkö	Maha	Duodenum	Jejunum ₁	Jejunum ₂	Ileum ₁	Ileum ₂	Ileum ₃	Paksusuoli
Tilavuus (ml) ⁽¹⁾	47	126	44	31	24	18	12	9.7
Ph ⁽¹⁾	1.2	4.0	4.0	6.4	6.6	6.9	7.4	6.4-6.8

1) Sutton 2009

Näillä mallin fysiologisilla puutteilla saattaisi olla merkitystä BE-riskiarvion kannalta erityisesti sellaisten lääkeaineiden kohdalla, joiden imeytymistä rajoittaa saturaatioliukoisuus (nestemäärät GI-kanavassa), ja/tai jotka imeytyvät tehokkaimmin tietyltä GI-kanavan alueelta (pH GI-kanavassa), kuten esim. varfariini imeytyy etupäässä mahasta ja ohutsuolen alkupäästä. Tällöin simulaatiomallissa käytetään imeytymiselle kriittisillä alueilla tuloksia vääristäviä liukoisuuden, tilavuuden ja dissoluution nopeusvakion arvoja tapauksissa, joissa valmisteiden välillä esiintyy eroa dissoluutioprofiileissa alhaisemmissa pH-tasoissa kuin 6.8. Lisäksi simulaatioissa imeytymistä tapahtuu pitkin ohutsuolta, jolloin alueellisen imeytymisen mahdollinen kriittisyys erottelun kannalta peittyisi, ja simulaatioprofiileissa ei nähtäisi eroa bioekvivalenssia kuvaavissa parametreissa.

Lisäksi on huomioitava, että simulaatiomallin kineettisiä prosesseja (hajoaminen, dissoluutio ja imeytyminen) saattaa edelleen monimutkaistaa tapahtumasarja; ylikyllästys (supersaturaatio), saostuminen, ja uudelleen liukeneminen (Sutton 2009), mitä mallissa ei erikseen huomioitu. Näihin tekijöihin vaikutta oleellisesti GI-kanavassa olevan nesteen määrä, jolloin mallissa käytetyt tilavuudet saattavat olla merkittävä tekijä mallin kyvyssä erotella niukkaliukoisia lääkeaineita sisältävien valmisteiden lisäksi myös sellaiset lääkevalmisteet, jotka sisältävät huonosti veteen liukenevia (polymeerejä) tai liukoisuutta parantavia apuaineita.

Tiettyjen lääkeaineiden kohdalla imeytymistä tapahtuu myös mahasta ja paksusuolesta. Imeytyminen on kuitenkin mahasta ja paksusuolesta pientä verrattuna imeytymiseen ohutsuolesta mahaan ja suoleen liittyvien fysiologisten erojen takia. Joten tämän, sekä

edellä kuvattujen simulaatiotutkimusten perusteella voisi kuitenkin olettaa, ettei näillä tekijöillä ole vaikutusta IR-formulaatioiden bioekvivalenssiin *in vivo*, eikä näin mallilla tehdyn BE-riskiarvion luotettavuuteen.

Teoriassa simulaatiot antavat varmimmin luotettavan tuloksen, kun lääkevalmisteen kulkeutumiseen ja lääkeaineen kinetiikkaan liittyvien prosessien voidaan olettaa olevan lineaarista. Käytännön *in vivo* tilanteessa tämä tarkoittaa, että ennen imeytymistä tapahtuva lääkeaineen vapautuminen valmisteesta, sen jälkeen tapahtuva imeytyminen systeemiseen verenkiertoon, mikä tahansa lääkeaineen presysteeminen muuttuminen suolen luumenissa, ja kulkeutuminen suolen seinämässä, on oltava annoksesta riippumattomia ja ei-saturoituvia. BE-riskiarvion kannalta oli kuitenkin riittävää, että tutkittujen formulaatioiden välillä ei esiintynyt eroavaisuuksia, jotka olisivat vaikuttaneet edellä mainittuihin prosesseihin, esimerkiksi tietyt apuaineet ovat efflux-transporttereiden substraatteja.

5.1.3 Variaation vaikutus

In vivo BE-tutkimuksissa, aineisto on useimmiten kerätty vaihtovuoroisesti, jolloin kukin yksilö on oma verrokkinsa ja yksilöiden välisen variaation merkitys kumoutuu. Sen sijaan yksilön sisäinen vaihtelu voi vaikuttaa simulaatiomallilla tehdyn BE-riskiarvion luotettavuuteen. Tästä syystä lääkeaineen ominaisuudet tulee tässäkin mielessä selvittää huolellisesti kirjallisuudesta, jotta voidaan paremmin arvioida etukäteen, voisiko *in vivo* variaatio vaikuttaa tehdyn BE-riskiarvion pätevyYTEEN, ja tarvitaanko halutun BE-tuloksen saamiseksi useampi henkilö *in vivo* BE-tutkimukseen.

Variaatiota saattaa esiintyä myös GI-kanavan fysiologisissa tekijöissä, kuten ohutsuolen kulkeutumisajassa, mahan tyhjenemisnopeudessa tai vaihtelevissa pH-ominaisuuksissa vatsassa tai ohutsuolessa, mitkä edelleen aiheuttavat variaatiota lääkkeen imeytymisen nopeuteen ja imeytyneeseen määrään. Kuitenkin tiedetään, että ohutsuolessa kulkeutumiseen ei liity suurta yksilön sisäistä vaihtelua ja se ei myöskään riipu formulaatio tyypistä tai ravinnosta (Christensen ym. 1985; Davis ym. 1986; Coupe ym. 1991; Wilding ym. 2003). Mahan tyhjenemisnopeudenkin vaikutus voitiin huomioida

simulaatioissa melko tarkasti, jos valmistetyyppi ja hajoamistapa olivat tiedossa, ja lisäksi siihen liittyvää variaation vaikutusta voitiin arvioida aiemmin kuvatuilla herkkyysanalyysillä. Vaihtelevien pH-olosuhteiden vaikutusta ei kuitenkaan erikseen tutkittu, kuin ainoastaan jossain määrin varfariinin kohdalla. Tiedetään kuitenkin, etteivät vaihtelevat pH-olot vaikuta BCS I ja III luokan nopeasti liukeneviin lääkeaineisiin (parasetamoli). Lääkeaineille BCS-luokissa II ja IV, joiden liukoisuus on heikkoa ja usein pH-riippuvaista (ibuprofeeni, varfariini ja alpratsolaami), sillä voi sen sijaan olla vaikutusta.

5.1.4 Lääkeainekohtaisten tekijöiden vaikutus

Jos lääkevalmisteiden vaikuttavissa aineissa esiintyy eroavaisuuksia joissakin spesifeissä kemiallisissa reaktioissa (hajoaminen, saostuminen, aggregaatio/kompleksin muodostus muiden aineiden kanssa), saattaa tällä olla vaikutusta mallilla tehdyn BE-riskiarvion luotettavuuteen. Kyseisiä ilmiöitä ei ole helppo havaita *in vitro* kokeen tuloksista, eikä näin ollen ottaa huomioon simulaatiomallinnuksessa (Kd-arvossa), elleivät ne johdonmukaisesti esiintyisi kaikkien tutkittavien lääkevalmisteiden kohdalla. Osa kuvatuista reaktioista voi liittyä jossain määrin myös yksilön sisäiseen/yksilöiden väliseen vaihteluun.

Käytännön esimerkkinä voisi olla tilanne, jossa toisen valmisteen vaikuttava-aine olisi suolamuodossa ja toinen molekyyli muodossa. Tällöin toisen valmisteen vaikuttava-aine saattaisi muodostaa mahassa/suolessa helpommin ei-imeytyviä komplekseja formulaation apuaineiden kanssa. Niukkaliukoisten lääkeaineiden kohdalla saattaisi muodostua paremmin liukeneva kompleksi. Lisäksi tietyt suolamuodot voivat hajota herkemmin mm. mahan happamassa pH:ssa ja aiheuttaa epätarkkuutta mallin erottelukykyn.

Muita vastaavia esimerkkejä eroista valmisteiden lääkeaineessa ovat: erilaiset esterit, kompleksit tai johdannaiset, isomeerit, isomeeriseokset, ja kiinteän lääkeaineen kiderakenne (polymorfia, amorfiset muodot, solvaatit, hydraatit). Kuitenkin, jos jokin näistä (vaikuttavassa aineessa esiintyvistä eroista) vaikuttaa liukenemiseen/liukoisuuteen, pitäisi sen tulla huomioiduksi simulaatiomallissa

käytetyssä Kd-arvossa, jos käytetty *in vitro* -liukenemisen tutkimusmenetelmä on ollut erotteleva. Eikä tekijällä tällöin pitäisi olla vaikutusta BE-erotteluun.

5.2 Simulaatiomallinnus tulevaisuudessa

CAT-malliin pohjautuen on rakennettu edistyneempi ACAT-malli (Advanced Compartmental Absorption and Transit Model)-malli (Agoram ym. 2001), jossa huomioidaan ensikierronmetabolia, aktiivinen kuljetus, lääkeaineen hajoaminen ja paksusuolesta imeytyminen. ACAT-mallia on jatkokehitetty kaupalliseksi tietokonesovellukseksi, GastroPlusTM (Löbenberg ym. 2000; Okumu ym. 2008). Monissa tutkimuksissa GastroPlusTM on yhdistetty lääkkeen fysikaalikemiallisiin ominaisuuksiin ja fysiologisiin parametreihin. Lisäksi sen avulla on voitu tukia entistä paremmin erilaisten formulaatiotekijöiden, kuten liukoisuuden, annosmuodon, annoksen tilavuuden, lääkepartikkelikoon (tiheys, efektiivinen säde) ja kokojakauman merkitystä lääkeaineen imeytymisen kannalta (Dannenfelser ym. 2004; Kuentz ym. 2006; Wei ym. 2008). GastroPlusTM on siis erittäin käyttökelpoinen lääkekehityskaaren loppuvaiheissa, kuten myös formulaation toimivuuden arvioinnissa, koska sen avulla voidaan helposti yhdistää erilaista aineistoa, ja se ottaa huomioon ensikierronmetabolia, lääkeaineen aktiiviset ja passiiviset kulkeutumisprosessit. Tästä syystä sen käyttökelpoisuutta myös lääkevalmisteiden erottelussa ja edelleen BE-riskiarviossa olisi mielenkiintoista kokeilla ja verrata tuloksia CAT-simulointeihin.

Heikkoutena GastroPlusTM:ssa on sen kaupallisuus, jonka takia se ei ole ns. läpinäkyvä. Mallin rakennetta, yhtälöitä ja parametreja ei kokonaisuudessaan tunneta, tiedetään vain, mitä aineistoa siihen tulee syöttää. GastroPlusTM:n avulla tehtyjä simulointeja ei pystytä myöskään muuntelemaan yhtä helposti, kuin Stella-ohjelmalla rakennettua CAT-mallia (Kortejärvi 2008), mikä kuitenkin olisi hyödyllinen ominaisuus, kun huomioidaan, että uutta aineistoa tulee jatkuvasti käyttöön pitkin lääkekehitysprosessia. Lisäksi itse-rakennettavat, läpinäkyvät mallit, antavat paremman mahdollisuuden oppimiseen, ja lääkkeen imeytymiseen kriittisesti vaikuttavien tekijöiden ymmärtämiseen (Kortejärvi 2008).

Esimerkkejä muista uusista simulaatiomallejista ovat Grass-malli (Grass 1997), GITA-malli (Sawamoto ym. 1997), ja ADAM-malli (Jamei ym. 2007; Dokoumetzidis ym. 2007). Näille malleille yhteistä on, että niistä on pyritty aikaansaamaan entistä ennustuskykyisempiä ja absoluuttisia lukuarvoja antavia. Jotta tähän on päästy, niissä on pyritty huomioimaan ja karakterisoimaan mahdollisimman monia maha-suolikanavan heterogeenisiä ominaisuuksia, kuten limakalvon nukkapinnan verenvirtaus, suolen enterosyyttien rakenne aluekohtaisesti, enterosyyttien proteiiniin sitoutuminen, sekä metaboliaentsyymien, ja transportterien rakenteiden erilainen ilmentyminen (Huang ym. 2009). Muut tekijät, kuten ruuan vaikutukset, ja lääke-lääke-interaktiot, mukaan lukien metaboliaentyymien ja transporttereiden induktoreiden ja inhibiittoreiden vaikutukset, saattavat kasvattaa yksilöiden välistä tai sisäistä variaatiota lääkeaineen imeytymisessä. Osassa uusimmista simulaatiomalleista (mm. GITA ja ADAM) on pyritty huomioimaan myös nämä tekijät. Tulevaisuudessa myös lääkeaineen oraalissa imeytymisessä esiintyvän populaation sisäisen ja keskinäisen vaihtelun ennustaminen olisi hyödyllistä ja tärkeää lääkeaineen kliinisen turvallisuuden ja tehon arvioinnissa.

Mallinnuksessa ja uusien mallien kehityksessä tarvitaan suuret määrät luotettavaa aineistoa. Jatkossa mallien kehityksen ja validoinnin kannalta olisikin hyödyllistä luoda sellaisia tietokantoja ja virtuaalikirjastoja, jotka sisältäisivät tarkkaa farmaseuttista ja farmakokineettistä informaatiota kaupallistetuista ja ei-kaupallistetuista lääkevalmisteista/lääkeaineista (Huang ym. 2009). Tämä nopeuttaisi ja helpottaisi mallinnusta, ja toisaalta saattaisi parantaa tulosten luotettavuutta ja vertailukelpoisuutta. Simulaatiomallinnuksesta saadut tulokset kun ovat korkeintaan yhtä luotettavia, kuin siinä käytetty lähdeaineisto. Lisäksi olisi mielekäästä koota ristiin vertailevaa, eri simulaatiomenetelmillä saatua, tutkimusaineistoa, joissa olisi käytetty samaa lääkeaine/lääkevalmiste joukkoa.

6 YHTEENVETO

Erikoistyössä käytetty simulaatiomalli osoittautui arvokkaaksi työvälineeksi arvioitaessa riskiä epäonnistua bioekvivalenssin saavuttamisessa testi ja referenssi valmisteille. Sillä kyettiin samanaikaisesti myös tutkimaan, mitkä tekijät olivat herkkiä *in vivo* bioekvivalenssia kuvaavien farmakokineettisten parametrien kannalta. Näin ollen mallia on mahdollisuus käyttää myös mm. parhaiten *in vivo* BE-tutkimuksiin soveltuvan kandidaatti formulaation valinnassa. Mikäli malli ennustaa hyvin BE-kokeen tuloksen, sitä voidaan hyödyntää BE-kokeen jälkeenkin, jos lääkevalmisteelle pitää myöhemmin tehdä pienempiä muutoksia formulaatiossa (esim. apuaineissa). Tällöin malli toimisi formulaatiokehityksen työkaluna. Toisaalta simulaatiot tukevat myös bioekvivalenssi-tutkimusasetelman suunnittelussa, esimerkiksi pohdittaessa variaatiota ja *in vivo* tutkimukseen tarvittavien tutkimushenkilöiden lukumäärää.

Kokeellisesta *in vitro* liukenemistutkimuksen aineistosta voidaan simulaatioiden avulla ennustaa *in vivo* BE-tutkimuksen riskiä kaikista tarkimmin tilanteessa, jossa *in vitro* liukenemisen testimenetelmä on tarpeeksi erotteleva (tehty mm. eri väliaineissa). Tällöin simulaatioissa käytetty, formulaatioiden eroa kuvaava, Kd-arvo on pätevä. Lisäksi simulaatiotulosten luotettavuuden kannalta on oleellista, että lääkeformulaatioista on riittävästi tietoa, eli tunnetaan valmistetyyppi ja formulaation sisältämät apuaineet. Luotettavuutta lisää, jos lääkevalmisteissa on samankaltainen koostumus apuaineita, jotka ovat hyvin tunnettuja. Kun kaikki edellä luetellut tekijät täyttyvät, malli ennustaa sellaisenaan parhaiten BE-riskiä BCS-luokan I, ja III lääkeaineille, sekä BCS-luokan II lääkeaineille, kun saturaatioliukoisuus koko fysiologisella pH välillä ei ole imeytymistä rajoittava tekijä. Muussa tapauksessa simulaatiotulosten tarkastelussa on kriittisesti arvioitava, tapauskohtaisesti, onko Kd-arvolla, apuaineilla, ja valmistetyypillä vaikutusta mallin kykyyn erotella formulaatiot toisistaan, ts. riskiarvion luotettavuuteen ja mallin ennustuskykyyn.

Lisäksi, yleisesti ottaen simulaatiomallinnuksen heikkoutena ovat oletukset, joita on tehtävä mm. mallin rakennusvaiheessa. Näin ollen tämänkin seikka tulee huomioida

simulaatiotulosten tarkastelussa tapauskohtaisesti, ja selvitettävä onko oletuksilla vaikutusta mallin erottelukykyyneen. Työn simulaatiomalli ei huomionnut mm. lääkeaineen hajoamista suolen luumenissa, aktiivisia kulkeutumismekanismeja, annos-riippuvaista farmakokinetiikkaa, alueellista lääkeaineen imeytymistä, eikä sellaisia apuaineiden vaikutuksia, mitkä eivät tule esille kokeellisessa *in vitro* liukenemistestauksessa. Tästä syystä mallinnuksella ei siis voitu ennustaa absoluuttisia plasmapitoisuuksia, vaan simulaatioista saatiin enemmänkin suuntaa antavaa tietoa, mikä kuitenkin oli riittävää tämän työn BE-riskiarvion kannalta.

On myös huomioitava, että käytetyn simulaatiomallin toimivuus ja hyödyllisyys on todistettu ainoastaan pienellä lääkeaine- ja formulaatio-otoksella. Jotta voitaisiin muodostaa yleispätevämpiä havaintoja, tulisi mallin toimivuutta testata suuremmalla, vaihtelevia ominaisuuksia sisältävällä testi-joukolla.

7 LÄHTEET

ACD/ChemSketch, version 6.0; Advanced Chemistry Development: Toronto, Canada.

ACD/Labs, version 6.0/11.0; Advanced Chemistry Development: Toronto, Canada.

Adams SS, Bough RG, Cliffe EE, Lessel B, Mills RFN: Absorption, distribution and toxicity of ibuprofen. *Toxicol Appl Pharmacol* 15: 310-330, 1969.

Agoram B, Woltosz WS, Bolger MB: Predicting the impact of physiological and biochemical processes on oral drug bioavailability. *Adv Drug Del Rev* 50: 41-67, 2001.

Amidon GL, Sinko PJ, Fleisher D: Estimating human oral fraction dose absorbed: A correlation using rat intestinal membrane permeability for passive and carrier-mediated compounds. *Pharm Res* 5: 651-654, 1988.

Amidon GL, Lennernas H, Shah VP, Crison JR: A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharm Res* 12: 413-420, 1995.

Ameer B, Divoll M, Abernethy DR, Greenblatt DJ, Shargel L: Absolute and relative bioavailability of oral acetaminophen preparations. *J Pharm Sci* 72: 955-958, 1983.

Andreasen PB, Vesell ES: Comparison of plasma levels of antipyrine, tolbutamide, and warfarin after oral and intravenous administration. *Clin Pharmacol Ther* 16: 1059-1065, 1974.

- Aungst BJ: Intestinal permeation enhancers. *J Pharm Sci* 89: 429-442, 2000
- Avdeef A: Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state). *Curr Top Med Chem* 1: 277-351, 2001
- Basit AW, Podczeck F, Newton JM, Waddington WA, Ell PJ, Lacey LF: Influence of polyethylene glycol 400 on the gastrointestinal absorption of ranitidine. *Pharm Res* 19: 1368-1374, 2002
- Bolger MB, Luckacova V, Wolotosz WS: Simulations of the nonlinear dose dependence for substrates of influx and efflux transporters in the human intestine. *AAPS J* 11: 353-363, 2009.
- Breckenridge AM, Orme M: Kinetics of warfarin absorption in man. *Clin Pharm Ther* 14: 955-961, 1973.
- Cheng H, Rogers JD, Demetriades JL, Holland SD, Seibold JR, Depuy E: Pharmacokinetics and bioinversion of ibuprofen enantiomers in humans. *Pharm Res* 11: 824-30, 1994.
- Christensen FN, Davis SS, Hardy JG, Taylor MJ, Whalley DR, Wilson CG: The use of gamma scintigraphy to follow the gastrointestinal transit of pharmaceutical formulations. *J Pharm Pharmacol* 37: 91-95, 1985
- Clements JA, Critchley JA, Prescott LF: The role of sulfate conjugation in the metabolism and disposition of oral and intravenous paracetamol in man. *Br J Clin Pharmacol* 18: 481-485, 1984.
- Corà LA, Romeiro FG, Americo MF, Oliveira RB, Baffa O, Stelzer M, de Arruda JR: Gastrointestinal transit and disintegration of enteric coated magnetic tablets assessed by ac biosusceptometry. *Eur J Pharm Sci* 27: 1-8, 2006
- Coupe AJ, Davis SS, Wilding IR: Variation in gastrointestinal transit of pharmaceutical dosage forms in healthy subjects. *Pharm Res* 8: 360-364, 1991
- Dannenfelser RM, He H, Joshi Y, Bateman S, Serajuddin ATM: Development of clinical dosage forms for a poorly water soluble drug I: application of polyethylene glycol-polysorbate 80 solid dispersion carrier system. *J Pharm Sci* 93:1165-75, 2004
- Davies NM: Clinical pharmacokinetics of ibuprofen. The first 30 years. *Clin Pharmacokinet* 34: 101-154, 1998.
- Davis SS, Hardy JG, Fara JW: Transit of pharmaceutical dosage forms through the small intestine. *Gut* 27: 886-892, 1986

Dokoumetzidis A, Kalantzi L, Fotaki N: Predictive models for oral drug absorption: from in silico methods to integrated dynamical models. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 3: 491-505, 2007.

Dressman. JB, Fleisher D: Mixing-tank model for predicting dissolution rate control of oral absorption. *J Pharm Sci* 75: 109-116, 1986.

Dressman JB, Fleisher D, Amidon GL: Physicochemical model for dose-dependent drug absorption. *J Pharm Sci* 73: 1274-1279, 1984.

Dressman. JB, Amidon GL, Fleisher D: Absorption potential: estimating the fraction absorbed for orally administered compounds. *J Pharm Sci* 74: 588-589, 1985.

DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Cheng D, Shrivastava S, Tzur D, Gautam B, Hassanali M. *Nucleic Acids Res.* 2008 Jan;36(Database issue):D901-6. PMID: [18048412](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18048412/)

Eandi M, Viano I, Ricci Gamalero S: Absolute bioavailability of paracetamol after oral or rectal administration in healthy volunteers. *Arzneim-Forsch / Drug Res* 34: 903-907, 1984

EMA 2010, Guideline on the investigation of bioequivalence. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP).

Fleishaker JC, Phillips JP, Eller MG, Smith RB: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of alprazolam following single and multiple oral doses of a sustained-release formulation. *J Clin Pharmacol* 29: 543-549, 1989.

Forrest JAH, Clements JA, Prescott LF: Clinical pharmacokinetics of paracetamol. *Clin Pharmacokinet* 7: 93-107, 1982.

Gabard B, Nirnberger G, Schiel H, Mascher H, Kikuta C, Mayer JM: Comparison of the bioavailability of dexibuprofen administered alone or as part of racemic ibuprofen. *Eur J Clin Pharmacol* 48: 505-11, 1995

Goodacre, BC, Murry RJ: A mathematical model of drug absorption. *J Clin Hosp Pharm* 6: 117-133, 1981.

Grass GM: Simulation models to predict oral drug absorption from in vitro data. *Adv Drug Deliv Rev* 23: 199-219, 1997

Grattan T, Hickman R, Darby-Dowman A, Hayward M, Boyce M, Warrington S: A five way crossover human volunteer study to compare the pharmacokinetics of paracetamol following oral administration of two commercially available paracetamol tablets and three development tablets containing paracetamol in combination with sodium bicarbonate or calcium carbonate. *Eur J Pharm Biopharm* 49: 225-229, 2000.

Greenblatt DJ, Wright CE: Clinical pharmacokinetics of alprazolam. Therapeutic implications. *Clin Pharmacokinet* 24: 453-471, 1993

Hellström PM, Grybäck P, Jacobsson H: The physiology of gastric emptying. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 20: 397-407, 2006.

Ho NFH, Higuchi WI: Quantitative interpretation of in vivo buccal absorption of n-alkanoid acids by the physical model approach. *J Pharm Sci* 60: 537-541, 1971.

Ho NFH, Higuchi WI, Turi J: Theoretical model studies of drug absorption and transport in the GI tract (3). *J Pharm Sci* 61: 192-197, 1972

Ho NFH, Merkle HP, Higuchi WI: Quantitative mechanistic and physiologically realistic approach to the biopharmaceutical design of oral drug delivery systems. *Drug Del Ind Pharm* 9: 1111-1184, 1983a

Ho NFH, Park JY, No PF, Higuchi WI: Advanced quantitative and mechanistic approaches in interfacing gastrointestinal drug absorption studies in animals and humans. Kirjassa: *Animal Models for Oral Drug Delivery in Man: In Situ and In Vivo Approaches*, ss. 27-106. Toim. Crouthanel W, Sarapu AC, American Pharmaceutical Association, Washington, DC 1983b

Hogben CAM, Tocco DJ, Brodie BB, Schanker LS: On the mechanism of intestinal absorption of drugs, *J. Pharmacol Exp Ther* 125: 275-282, 1959.

Higgins JD, Gilmore TP, Martellucci SA, Bruce RD.: Analytical profiles of drug substances and excipients, ss. 265-330, 27. painos. Academic Press, Brittain HG, London 2001

Heading RC, Nimmo LF, Prescott LF, Tothill P: The dependence of paracetamol absorption on the rate of gastric emptying. *Br J Pharmacol* 47: 415– 421, 1973.

Hellström PM, Grybäck P and Jacobsson H: The physiology of gastric emptying. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 20: 397-407, 2006

Hofmann AF, Pressman JH, Code, CF Witztum KF: Controlled entry of orally administered drugs: physiological considerations. *Drug Devel Ind Pharm* 9: 1077-109, 1983

Huang W, Lee SL, Yu LX: Mechanistic approaches to predicting oral drug absorption. *AAPS J* 11: 217-24, 2009

Jacobs MH: Some aspects of cell permeability to weak electrolytes. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 8: 30-39, 1940

Jamei M, Yang J, Turner D, Yeo KR, Tucker GT, Rostami-Hodjegan A: A novel physiologically-based mechanistic model for predicting oral drug absorption: the

advanced dissolution absorption, and metabolism (ADAM) model. 4th World Conference on Drug Absorption, Transport and Delivery (WCDATD) 2007

Kalantzi L, Reppas C, Dressman JB, Amidon GL, Junginger HE, Midha KK, Shah VP, Stavchansky SA, Barends DM: Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Acetaminophen (Paracetamol). *J Pharm Sci* 95: 4- 14, 2006

Kelly KA: Motility of the stomach and gastroduodenal junction. *Kirjassa Physiology of the gastrointestinal tract* ss. 393-410, 1. painos. Toim. Johnson LR, Raven Press, New York 1981

Koch KM, Parr AF, Tomlinson JJ, Sandefer EP, Digenis GA, Donn KH, Powell JR: Effect of sodium acid pyrophosphate on ranitidine bioavailability and gastrointestinal transit time. *Pharm Res* 10: 1027-1030, 1993

Kortejärvi H: Modelling and simulation approaches for waiving in vivo pharmacokinetic formulation studies. Doctoral dissertation (article-based). Research and Development, Orion Pharma, University of Helsinki, Faculty of Pharmacy: Division of Biopharmaceutics and Pharmacokinetics. 2008-06-19.

Kortejarvi H, Urtti A, Yliperttula M: Pharmacokinetic simulation of biowaiver criteria: the effects of gastric emptying, dissolution, absorption and elimination rates. *Eur J Pharm Sci* 30: 155–66, 2007.

Kuentz M, Nick S, Parrott N, Rothlisberger D: A strategy for preclinical formulation development using Gastroplus as pharmacokinetic simulation tool and a statistical screening design applied to a dog study. *Eur J Pharm Sci* 27: 91–99, 2006.

Laihanen N, Muttonen E, Laaksonen M: Solubility and Intrinsic Dissolution Rate of Alprazolam Crystal Modifications. *Pharm Dev Technol*, 1: 373-380, 1996

Levine MA, Walker SE, Paton TW: The effect of food or sucralfate on the bioavailability of S(+) and R(-) enantiomers of ibuprofen. *J Clin Pharmacol* 32: 1110–1114, 1992.

Linnankoski J, Mäkelä JM, Ranta V-P, Urtti A and Yliperttula M: Computational prediction of oral drug absorption based on absorption rate constants in humans. *J Med Chem* 49: 3674-81, 2006

Lionberger RA: FDA Critical Path Initiatives: Opportunities for Generic Drug Development. *AAPS J* 10: 103-109, 2008

Lockwood GF, Albert KS, Gillespie WR, Bole GG, Harkcom TM, Szpunar GJ, Wagner JG: Pharmacokinetics of ibuprofen in man. I. Free and total area/dose relationships. *Clin Pharmacol Ther* 34: 97–103, 1983

Lääkietietokeskus. Tilastot lääketutkimukseen liittyen. Haettu 23.12.2009 internetistä: http://www.laaketietokeskus.fi/page.php?page_id=178

Lääkkeet ja Hinnat –tietokanta. sisältää Pharmaca Fennican valmisteyhteenvedot. Suomen Apteekkariliitto, Salvia; Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskus Fimea; Lääketietokeskus Oy, Pharmaca Fennica; Suomen Lääkeohje Oy Lähdeaineisto päivitetty: 1.2.2010. Haettu 1.2.2010 internettistä: <http://www.terveysportti.fi/terveysportti/laakkeet.koti>

Löbenberg R, Amidon GL: Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *Eur J Pharm Biopharm* 50: 3-12, 2000

Madsen JL, Jensen M: Effects of gender, age, and body mass index on gastrointestinal transit times. *Dig Dis Sci* 37: 1548-1553, 1992

Martin W, Koselowske G, Toberich H, Kerkmann T, Mangold B, Augustin J: Pharmacokinetics and absolute bioavailability of ibuprofen after oral administration of ibuprofen lysine in man. *Biopharm Drug Dispos* 11: 265–278, 1990

Martinez MN, Amidon GL: A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. *J Clin Pharmacol* 42: 620–43, 2002

Meyer JH: Motility of the Stomach and Gastroduodenal Junction. Kirjassa: *Physiology of Gastrointestinal Tract*, ss. 613-629, 2. painos. Toim. Johnson LR, Raven Press, New York 1987

Cho MJ, Sethy VH, Haynes LC: Sequentially Labile Water Soluble Prodrugs of Alprazolam *J Med Chem* 29: 1346-1350, 1986

Ni PF, Ho NFH, Fox JF, Leuenberger H, Higuchi WI: Theoretical model studies of intestinal drug absorption V: nonsteady-state fluid flow and absorption. *Int J Pharmaceut* 5: 33-47, 1980

Oberle RL, Chen T-S, Lloyd C, Barnett JL, Owyang C, Meyer J, Amidon GL: The influence of the interdigestive migrating myoelectric complex in the gastric emptying of liquids. *Gastroenterology* 99: 1275–1282, 1990

Okimoto K, Rajewski RA, Uekama K, Jona JA, Stella VJ: The interaction of charged and uncharged drugs with neutral (HP- β -CD) and anionically charged (SBE7- β -CD) β -cyclodextrins. *Pharm Res* 13: 256–264, 1996

Okumu A, Dimaso M, Lobenberg R: Dynamic dissolution testing to establish in vitro/in vivo correlations for montelukast sodium, a poorly soluble drug. *Pharm Res* 25: 2778–85, 2008

O'Reilly RA, Aggeler PM, Leong LS: Studies of the coumarin anticoagulant drugs: the pharmacodynamics of warfarin in man. *J Clin Invest* 42: 1542-51, 1963

- O'Reilly R, Aggeler PM, Leong LS. Studies on the coumarin anticoagulant drugs: a comparison of the pharmacodynamics of dicumarol and warfarin in man. *Thromb Diath Haemorrh* 11: 1-22, 1964.
- O'Reilly RA, Nelson E, Levy G: Physicochemical and physiologic factors affecting the absorption of warfarin in man. 55: 435-437, 1966
- O'Reilly RA, Welling PG and Wagner JG: Pharmacokinetics of warfarin following intravenous administration to man. *Thromb Diath Haemorrh*. 25: 178-86, 1971
- Palareti G, Legnani C: Warfarin withdrawal. Pharmacokinetic-pharmacodynamic considerations. *Clin Pharmacokinet* 30: 300-313, 1996
- Paliwal JK, Smith DE, Cox SR, Berardi RR, Dunn- Kucharski VA, Elta GH: Stereoselective, competitive, and nonlinear plasma protein binding of ibuprofen enantiomers as determined in vivo in healthy subjects. *J Pharmacokinet Biopharm* 21: 145-61, 1993
- Perucca E, Richens A: Paracetamol disposition in normal subjects and in patients treated with antiepileptic drugs. *Br J Clin Pharmacol* 7:201-206, 1979.
- Polli JE, Rekhi GS, Shah VP: Methods to compare dissolution profiles. *Drug Inf J* 30: 1091-1104, 1996
- Potthast H, Dressman JB, Junginger HE, Midha KK, Oeser H, Shah VP, Vogelpoel H, Barends DM: Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Ibuprofen. *J Pharm Sci* 94: 2121-2131, 2005.
- Prescott LF: Kinetics and metabolism of paracetamol and phenacetin. *Br J Clin Pharmacol* 10: 291-298, 1980
- Rawlins MD, Henderson DB, Hijab AR: Pharmacokinetics of paracetamol (acetaminophen) after intravenous and oral administration. *Eur J Clin Pharmacol* 11: 283-286, 1977
- Rege BD, Yu LX, Hussain AS, Polli JE 2001: Effect of common excipients on Caco-2 transport of low-permeability drugs. *J Pharm Sci* 90: 1776-1786, 2001
- Rick NG: *Drugs: From Discovery to Approval*, ss. 1-18, 2. painos. John Wiley & Sons, Inc, New Jersey. Julkaistu internetissä 2005.
- Rowland M, Tozer T.N. *Clinical Pharmacokinetics, Concepts and Applications*. 3. painos. Lippisott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1995.
- Sawamoto T, Haruta S, Kurosaki Y, Higaki K, Kimura T: Prediction of the plasma concentration profiles of orally administered drugs in rats on the basis of gastrointestinal transit kinetics and absorbability. *J Pharm Pharmacol* 49:450-457, 1997.

Schanke LS: On the mechanism of absorption from the gastrointestinal tract. *J Med Pharm Chem* 2: 343, 1960.

Schanke LS, Shore PA, Brodie BB, Hogben CAM: Absorption of drugs from the stomach. *J Pharmacol Exp Ther* 120: 528–539, 1957

Schiller C, Fröhlich CP, Giesmann T, Siegmund T, Mönnikes H, Hosten N, Weitschies W: Intestinal fluid volumes and transit of dosage forms as assessed by magnetic resonance imaging. *Aliment Pharmacol Ther* 22: 971-979, 2005

Schulze JD, Waddington WA, Ell PJ, Parsons GE, Coffin MD, Basit AW: Concentration-dependent effects of polyethylene glycol 400 on gastrointestinal transit and drug absorption. *Pharm Res* 20: 1984-1988, 2003

Shaw LR, Irwin WJ, Grattan TJ, Conway BR: The Effect of Selected Water-Soluble Excipients on the Dissolution of Paracetamol and Ibuprofen. *Drug Dev Ind Pharm* 31: 515–525, 2005

Sinko PJ, Leesman GD, Amidon GL: Predicting fraction dose absorbed in humans using a macroscopic mass balance approach. *Pharm Res* 8: 979-988, 1991

Smith RB, Kroboth PD, Vanderlugt JT, Phillips JP, Hyhl RP: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of alprazolam after oral and IV administration. *Psychopharmacology* 84: 452-456, 1984

Smith DE, Paliwal JK, Cox SR, Berardi RR, Dunn- Kucharski VA, Elta GH: The effect of competitive and non-linear plasma protein binding on the stereoselective disposition and metabolic inversion of ibuprofen in healthy subjects. *Biopharm Drug Dispos* 15: 545–61, 1994

Smolen VF, Erb RJ: Predictive conversion of in vitro drug dissolution data into in vivo drug response versus time profiles exemplified for plasma levels of warfarin. *J Pharm Sci* 66: 297-304, 1977

STELLA® (Structural Thinking Experimental Learning Laboratory with Animation), version 8.1.1 isee systems, Lebanon, USA

Stella VJ, Mooney KG, Pipkin JD: Dissolution and ionization of warfarin. *J Pharm Sci* 73: 946-948, 1984

Stillings M, Havlik I, Chetty M, Clinton C, Schall R, Moodley I, Muir N, Little S: Comparison of the pharmacokinetic profiles of soluble aspirin and solid paracetamol tablets in fed and fasted volunteers. *Curr Med Res Opin* 16: 115– 124, 2000

Story DE: The role of dissolution testing in the design of immediate release dosage forms. *Drug Inf J* 30:1039-1044, 1996

Sutton SC: Role of physiological intestinal water in oral absorption. *AAPS J* 11: 277-285, 2009

Suzuki A, Higuchi WI, Ho NF: Theoretical model studies of drug absorption and transport in the gastrointestinal tract I. *J Pharm Sci* 59: 644-651, 1970

Tucker JJ, Sitsen JM, Gusdorf CF: Bioavailability of paracetamol after oral administration to healthy volunteers. Influence of caffeine on rate and extent of absorption. *Pharm Weekbl Sci* 8: 239-243, 1986

Wei H, Dalton C, Di Maso M, Kanfer I, Löbenberg R: Physicochemical characterization of five glyburide powders: a BCS based approach to predict oral absorption. *Eur J Pharm Biopharm* 69:1046–4056, 2008.

Wilding IR, Behrens C, Tardif SJ, Wray H, Bias P, Albrecht W: Combined scintigraphic and pharmacokinetic investigation of enteric-coated mesalazine micropellets in healthy subjects. *Aliment Pharmacol Ther* 17: 1153–1162, 2003.

Wilson CG, Washington N: The stomach: its role in oral drug delivery. Kirjassa: *Physiological Pharmaceutical: Biological Barriers to Drug Absorption*, ss. 47-70. Toim. Rubinstein MH, Ellis Horwood, Chichester, UK, 1989

WinNonlin, version 5.0.1; Pharsight Corporation: Mountain View, CA.

Wu C-Y, Benet LZ: Predicting Drug Disposition via Application of BCS: Transport/Absorption/Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System. *Pharmaceutical Research* 22: 11-23, 2005

Yu LX. An integrated model for determining causes of poor oral drug absorption. *Pharm Res.* 16:1883–1887, 1999.

Yu LX, Amidon GL: Characterization of small intestinal transit time distribution in humans. *Int J Pharm* 171: 157–163, 1998 a

Yu LX, Amidon GL: Saturable small intestinal drug absorption in humans: modeling and interpretation of cefatrizine data. *Eur J Pharm Biopharm* 45: 199–203 1998 b.

Yu LX, Amidon GL: A compartmental absorption and transit model for estimating oral drug absorption. *Int J Pharm* 186: 119-125, 1999

Yu LX, Crison JR, Amidon CJL: A strategic approach for predicting oral drug absorption. *Pharm. Res* 12: 8, 1995

Yu LX, Lipka E, Crison JR, Amidon GL: Transport approaches to the biopharmaceutical design of drug delivery system: prediction of intestinal absorption. *Adv Drug Deliv Rev* 19: 359-376, 1996 a

Yu LX, Crison JR, Amidon GL: Compartmental transit and dispersion model analysis of small intestinal transit flow in humans. *Int J Pharm* 140: 111-118, 1996 b