

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
katedra farmakologie a toxikologie

**BCS (Biofarmaceutický klasifikační systém) a
in vitro/in vivo korelace bioekvivalenčních studií**

(diplomová práce)

Hradec Králové, 2009

Radek Ćmiel

Prohlášení:

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

Podpis:

Poděkování:

Děkuji Doc. MUDr. Ivanu Tilšerovi, CSc. za záštitu pro sepsání této diplomové práce, za jeho vřelý a přátelský přístup při dokončování této práce a také MUDr. Tomáši Hauserovi a MUDr. Vitu Perlíkovi za odborné vedení a cenné rady, které byly pro sepsání mé práce nezbytné.

Souhrn:

Biofarmaceutický klasifikační systém (BCS) je vědecký rámcový postup určen ke klasifikaci léčiv do tříd podle jejich rozpustnosti ve vodném prostředí a jejich intestinální permeability. V případě, že se doplní tyto informace ještě o in vitro disoluční charakteristiky léčivého přípravku, jedná se pak v podstatě o tyto tři hlavní faktory: rozpustnost, intestinální permeabilitu a disoluční rychlost. Všechny tyto tři faktory velmi úzce souvisí s rychlostí a mírou absorpce IR pevných per os podávaných lékových forem.

Tato práce podává především přehled o BCS z dvou hlavních úhlů pohledu, a to z pohledu Světové zdravotnické organizace (WHO) a z pohledu americké „U.S. Food and drug administration“ (FDA) a v téměř plném znění v českém jazyce cituje směrnici FDA pro tzv. „biowaiver“ žádosti, a také úvahy o in vitro in vivo korelacích ve vývoji IR lékových formulací.

Další část této práce uvádí přehled bioekvivalenčních studií české farmaceutické firmy Zentiva, k. s. v kontextu BCS a srovnává výsledky s údaji získanými od kanadské firmy Anapharm, která je smluvním partnerem mnoha farmaceutických společností zabývajících se klinickým výzkumem a bioekvivalenčními studii.

Klíčová slova:

Biofarmaceutický klasifikační systém, rozpustnost, permeabilita, disoluce, in vivo/in vitro korelace, Caco-2 buňky, bioekvivalence, IR lékové formy, biowaiver.

Abstract:

Biopharmaceutical classification system is a scientific framework for classifying a drug substance into the groups based on its aqueous solubility and intestinal permeability. When combined with the *in vitro* dissolution characteristics of the drug product, then there are three major factors: solubility, intestinal permeability and dissolution rate. All these three factors correspond closely with the rate and extent of oral drug absorption from IR solid oral-dosage forms.

This work presents the overview about the BCS from two major points of view, from the site of the World health organization (WHO) and U.S. Food and drug administration (FDA), while the FDA guideline for biowaiver is fully cited in Czech language. Also reflection of *in vitro* *in vivo* correlations in IR drugs development according to BCS is mentioned.

Further, the thesis is analyzing the bioequivalence studies of Czech pharmaceutical company Zentiva, k. s. in context of BCS and compares the results with data obtained from the Canadian CRO Anapharm, which is a contract partner of many pharmaceutical companies being engaged in a clinical research and bioequivalence studies.

Keywords:

Biopharmaceutical classification system, solubility, permeability, dissolution, *in vivo*/*in vitro* correlations, Caco-2 cells, bioequivalence, IR drug formulations, biowaiver.

Obsah:

ZKRATKY	8
1. ÚVOD	9
1.1. CÍL PRÁCE	10
2. TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1. PŘEDSTAVENÍ.....	11
2.2. VYSVĚTLENÍ POJMU BIOWAIVER.....	11
2.3. IN VITRO IN VIVO KORELACE (IV-IVC)	12
2.3.1. Fyzikálně-chemické vlastnosti.....	14
2.3.1.1. Rozpustnost.....	14
2.3.1.2. pKa.....	15
2.3.1.3. Tvorba solí	16
2.3.1.4. pH difúzní vrstvy	17
2.3.1.5. Velikost částic.....	17
2.3.1.6. Polymorfismus	18
2.3.2. Biofarmaceutické vlastnosti.....	19
2.3.2.1. Permeabilita léčiva.....	19
2.3.2.2. Stanovení permeability	20
2.3.2.2.1. In vitro modely	20
2.3.2.2.1.1. In vitro biologické metody (Caco-2 buňky).....	21
2.3.2.2.1.2. Caco-2 výsledky.....	22
2.3.2.2.2. In vivo perfúzní modely.....	23
2.3.2.2.2.1. Zvířecí perfúzní studie.....	23
2.3.2.2.2.2. Lidské perfúzní studie	24
2.3.2.3. Ionizace	24
2.3.2.4. Rozdělovací koeficient.....	25
2.3.2.5. Absorpční potenciál	26
2.3.2.6. Polárně specifický povrch.....	26
2.3.3. Fyziologické faktory.....	26
2.3.3.1. Obsah GIT	26
2.3.3.2. Gastrointestinální pH	27
2.3.3.3. Tranzitní časy GIT	28
2.3.3.4. Motilita GIT	28
2.3.3.5. IV-IVC lékových forem.....	29
2.4. BIOFARMACEUTICKÝ KLASIFIKAČNÍ SYSTÉM	29
2.4.1. První zmínky o BCS	29
2.4.2. Základy Biofarmaceutického klasifikačního systému	30
2.4.3. Lékové formy, které mohou být za současných podmínek aplikovány postupem biowaiver žádosti podle FDA.....	31
2.5. SMĚRNICE FDA PRO BCS.....	32
2.5.1. BCS podle FDA	32
2.5.1.1. Rozpustnost.....	33
2.5.1.2. Permeabilita	33
2.5.1.3. Disoluce	33
2.5.2. Doporučené metody určené ke klasifikování jednotlivých léčiv a určování jejich disolučních charakteristik	34

2.5.2.1. Určení rozpustnosti zkoušeného léčiva	34
2.5.2.2. Určení permeability zkoušeného léčiva	35
2.5.2.2.1. Farmakokinetické studie na dobrovolnících	35
2.5.2.2.2. Metody k určení intestinální permeability	36
2.5.2.2.3. Nestability v GIT	39
2.5.2.3. Zjišťování disolučních charakteristik a podobností disolučních profilů	39
2.5.3. Rozšiřující úvahy pro aplikování biowaiver	41
2.5.3.1. Excipienty	41
2.5.3.2. Proléčiva	41
2.5.3.3. Výjimky, kdy nelze aplikovat biowaiver	42
2.5.4. Aplikování BCS regulačními autoritami	42
2.5.4.1. IND/NDA	42
2.5.4.2. ANDA – zkrácená registrace nových léčiv	43
2.5.4.3. Poregistrační změny	43
2.5.5. Data, která podporují biowaiver žádosti	44
2.5.5.1. Data podporující vysokou rozpustnost	44
2.5.5.2. Data podporující vysokou permeabilitu	45
2.5.5.3. Data podporující rychlou a podobnou disoluci	46
2.5.5.4. Doplnkové informace	46
2.5.5.5. Příloha „A“ směrnice FDA	47
2.6. EMEA KONCEPT Z ROKU 2007	47
2.6.1. WHO revidovaná kritéria pro BCS klasifikaci	48
2.6.1.1. WHO definice vysoké rozpustnosti (solubility)	48
2.6.1.2. WHO definice permeability	49
2.6.1.3. WHO rozšíření oblasti pro aplikování biowaiver žádosti	49
2.6.2. WHO dodatečná kritéria pro aplikaci biowaiver žádosti	50
2.6.2.1. Následné podmínky WHO	51
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY	54
3.1. PŮVODNOST DAT	54
3.2. ZÁMĚR	54
3.3. PŘEHLED AKTIVNÍCH LÁTEK V PORTFOLIU ZENTIVY V IR LÉKOVÝCH FORMÁCH	55
3.4. SROVNÁNÍ PORTFOLIA ZENTIVY V MEZINÁRODNÍM MĚŘITKU Z POHLEDU BCS	56
3.5. POČET ÚČINNÝCH LÁTEK (VČ. METABOLITŮ) PODLE BCS	58
3.6. POČET BE-STUDIÍ PODLE BCS	59
3.7. ÚSPĚŠNOST BE-STUDIÍ	59
4. DISKUZE	61
5. ZÁVĚR	61
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	63

ZKRATKY

ANDA	Zkrácená registrace nových léčiv
API	Hlavní účinná látka
AUC	Plocha pod křivkou
BA	Biologická dostupnost
BCS	Biofarmaceutický klasifikační systém
BE	Bioekvivalence
BE-studie	Bioekvivalenční studie
Caco-2	Buňky lidského adenokarcinomu tlustého střeva
C _{max}	Maximální naměřená koncentrace
EMA	European medicines agency
EML	WHO modelový seznam základních léčiv
ES	Efflux pump substrate
FDA	U.S. Food and drug administration
GI	Gastrointestinální
GIT	Gastro-intestinální trakt
IND	Investigational new drug application
IR	Immediate release – s okamžitým uvolňováním
IS	Internal standard
IV-IVC	In vitro – in vivo korelace
MAD	Maximálně absorbovatelná dávka
NDA	New drug application
P-gp	P-glykoprotein
PSA	Polar surface area
rpm	počet otáček za minutu
SITT	Small intestine transit time
SIWV	Small intestine water volume
SUPAC	Scale-up and postapproval changes
USP	United States pharmacopeia
WHO	Světová zdravotnická organizace

1. ÚVOD

Na základě neustále se zvyšujících nákladů na vývoj zcela nových léčivých molekul byl vymyšlen Biofarmaceutický klasifikační systém (BCS), který přináší průlom do výzkumu a vývoje léčiv. Existuje určitý ekonomický tlak nejenom ze strany farmaceutického průmyslu, ale i ze strany Světové zdravotnické organizace (WHO), jejímž zájmem je přinést levnější, kvalitnější a v dostatečném množství dostupnou léčbu pro pacienty v málo vyspělých zemích, především ve formách levnějších generických léčiv.

Biofarmaceutický klasifikační systém, se soustřeďuje především na tyto tři hlavní faktory: rozpustnost, permeabilitu a rychlost disoluce léčivých přípravků. Každé léčivo lze zařadit právě do jedné ze čtyř tříd, na základě nízké/vysoké rozpustnosti a nízké/vysoké permeability. Léčivý přípravek musí splňovat po stránce lékové formy určité vlastnosti, aby pak mohla být použita tzv. „biowaiver“ metodika pro vyhnutí se bioekvivalenční studii (BE-studie) a metodika související s žádostí o zaregistrování léčivého přípravku u registračních autorit. Aby byl akceptován postup přes tzv. „biowaiver“ musí spadat aktivní léčivá látka obsažena v léčivém přípravku do BCS třídy I (v poslední době má EMEA snahu umožnit aplikovat „biowaiver“ postup i pro molekuly BCS třídy III) (EMEA, 2008). Díky tomuto novému postupu lze ušetřit nemalé finanční zdroje a zároveň omezit riziko možných nežádoucích účinků, které mohou nastat během klinického vývoje a bioekvivalenčních studií.

Bohužel jsou nastavená kritéria pro zařazení léčiv do jednotlivých tříd příliš striktní, a proto ne mnoho z nich spadá do BCS třídy I. Americká národní léková regulační agentura (U.S. Food and drug administration - FDA) stále zadržuje přísně nastavené limity, zatímco WHO vyvíjí snahu tyto limity rozšířit, neboli zlehčit. Aby bylo možné obejít studie na dobrovolnících, byly vyvinuty in vitro a in situ modely zdánlivě napodobující situaci v GIT lidského organismu. Mezi ně patří např. Caco-2 buněčné linie.

1.1. CÍL PRÁCE

V experimentální části své diplomové práce uvedu reálná data získaná z BE-studií, která jsem shromažďoval po dobu mé stáže v letech 2007 a 2008 ve farmaceutické firmě Zentiva, k. s. Mým cílem je popsat aktuální situaci kolem biofarmaceutického systému a poukázat na určité souvislosti vyskytujících se chyb při provádění BE-studií spolu se zařazením účinných látek do BCS tříd.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. PŘEDSTAVENÍ

Základní koncept biofarmaceutického klasifikačního systému (BCS) byl publikován Amidonem v roce 1995 (Amidon et al., 1995) a konečně představuje možnost jak nahradit in vivo bioekvivalenční studie (BE-studie) výsledky určitého srovnání in vitro testů, které dokazují bioekvivalenci perorálně aplikované rychle se rozpadající lékové formy se systémovým účinkem. Tento koncept je zamýšlen tak, aby bylo možno omezit některé in vivo BE-studie, nicméně je však omezen jenom na některá léčiva, ve smyslu jejich rozpustnosti, permeability, terapeutického rozmezí a nekritických lékových forem. I když je toto téma neustále častěji diskutováno, tak přesto tento koncept, upuštění od nutnosti provádět in vivo BE-studií založen na BCS, se uplatňuje v praxi velmi málo. Pravděpodobný důvod lze nacházet zřejmě na straně jak farmaceutických výrobců, tak i na straně regulačních autorit. Podstatné rozdíly v posudcích a rozdíly u různých stanovení přispívají k dojmu, že zde jakoby chybí základní porozumění BCS konceptu pro podporu „biowaiver“ žádostí. Objevují se proto určité snahy v rámci evropské komunity k dosažení optimálního a harmonizovaného používání principů pro „biowaiver“ žádosti, ve smyslu vytvoření doplňku pro směrnice zabývající se biologickou dostupností a bioekvivalenci (EMA, 2007).

2.2. VYSVĚTLENÍ POJMU BIOWAIVER

Pojem biowaiver se nedá přeložit jedním slovem, ačkoli se nabízí s nadsázkou slovo „bioodpustek“, které stejně nevystihuje anglický termín plnou mírou. Biowaiver je postup, kdy se chce žadatel o zaregistrování svého produktu vyhnout nákladné cestě provádět srovnávání dvou sobě podobných produktů cestou bioekvivalenční studie prováděné na dobrovolnících. Je umožněno za určitých podmínek prominout, resp. úplně odpustit klinické hodnocení ve smyslu bioekvivalenční studie za předpokladu, že hodnocená léčivá látka je z BCS třídy I a má vhodné vlastnosti k aplikování FDA směrnice

pro biowaiver žádosti publikované v roce 2000 (FDA, 2000). Tato směrnice zajišťuje doporučení pro sponzory, kteří se zabývají žádostmi pro vývoj nových léčiv, registrací nových léčiv, zkrácenou registrací nových léčiv, a také tato směrnice obsahuje doplněk pro ty žadatele, kteří chtějí odpustit požadavek na stanovení in vivo biologické dostupnosti (BA) a/nebo bioekvivalence (BE) pro pevné, rychle se rozpadající (IR – immediate release) lékové formy na základě BCS systému, pro látky BCS třídy I.

Ve druhém případě lze zažádat o biowaiver za předem stanovených podmínek, kdy již byla provedena BE-studie na jiné lékové síle. Předpokladem pro takovou žádost je linearita farmakokinetických parametrů a rovněž i shodný výrobní postup. Bioekvivalenční studii pak nahrazuje srovnání in vitro disolučních profilů charakterizujících uvolňování účinné látky ze srovnávaných lékových forem, formulací. Příkladem by mohlo být např. provedení BE-studie s přípravkem candesartan se silami 32, 16 a 8 mg, kdy se studie provádí pouze na síle 32 mg. Na ostatní síly se aplikuje „biowaiver“, a to za podmínek proporcionálního složení, lineární farmakokinetiky a shodných disolučních profilů. Na nižších silách se pak studie nedělají.

2.3. IN VITRO IN VIVO KORELACE (IV-IVC)

Okolo 30 % potenciálních kandidátů na léčivé látky je zamítnuto kvůli problémům s farmakokinetikou. Když se zjistí u vyvíjeného léčiva chabé farmaceutické vlastnosti již během vývoje, je pak velmi nákladné vytvořit speciální formulaci, aby byl vliv těchto špatných farmaceutických vlastností minimalizován. Stejně tak toto tvrzení platí pro vyvíjenou lékovou formulaci generických léčivých přípravků. Je potřeba rychlých a spolehlivých in vitro strategií jak odhalit problematické molekuly v těch nejranějších fázích vývoje. Důvodem pro vznik chyb a selhání je většinou špatná rozpustnost a permeabilita molekul. FDA navržený BCS je úsilím o racionalizování kritických momentů spojených s absorpcí léčiv po podání ústy. Jádrem BCS je in vitro transportní model, zahrnující především permeabilitu a rozpustnost, který souvisí s pH podmínkami a disolucemi. Hlavní záměr BCS je umět předpovídat

in vivo chování léčivého přípravku na základě in vitro měřených permeabilit a rozpustností (Avdeef, 2001).

tab. 1. Poznámky k jednotlivým BCS třídám (Avdeef, 2001)

BCS I	rychlost disoluce podmiňuje in vivo absorpci
BCS II	rozpustnost limituje absorpční flux
BCS III	permeabilita určuje míru absorpce
BCS IV	nejsou očekávány žádné in vitro – in vivo korelace

Rychlost a míra absorpce léčiva po podání ústy jsou závislé na mnoha různých fyzikálně-chemických a fyziologických faktorech. Fyzikálně-chemické faktory jsou např. ionizační konstanta, rozdělovací koeficient, rozpustnost, rychlost disoluce, formy s krystalickou strukturou, povrchová plocha, atd. Mezi známé fyziologické faktory počítáme např. rozpustnost léčivého přípravku v gastrointestinálním (GI) prostředí, permeabilita léčiva přes GI membránu, GI pH profil, GI tranzitní čas, přítomnost žlučových solí a dalších fyziologických surfaktantů, efekt jídla atp.

V posledním desetiletí dosáhly IV-IVC na velkém významu ve vývoji farmaceutických produktů a obzvláště ty, které okamžitě uvolňují aktivní látku, tzv. IR lékové formy. Serajuddin (Serajuddin, 2002) uvedl v roce 2002 poznámku, že na základě screeningu, který provedl, došlo k dramatickému zvýšení lipofility u nových potenciálních kandidátů na léčiva, zato dochází k neustálému snižování rozpustnosti. Ještě v sedmdesátých a osmdesátých letech byla typická rozpustnost v rozsahu od 20 do 100 $\mu\text{g/ml}$. V současné době je situace velice odlišná, běžně dosahují kandidáti na nové látky vnitřní rozpustnosti méně než 1 $\mu\text{g/ml}$. Tyto fakta přinášejí nutnost zamýšlet se nad IV-IVC již během vývoje léčivých přípravků (Li et al., 2005).

2.3.1. Fyzikálně-chemické vlastnosti

Většina modelů nebo nástrojů používaných k předpovědi absorpce po podání ústy během vývoje lékové formy jsou do značné míry závislé na fyzikálně-chemických vlastnostech kandidátů na budoucí léčiva. Jako příklad můžeme uvést tyto modely: Předpokládaná pH závislost beroucí v potaz ionizaci a rozdělovací koeficient jako funkci pH; absorpční potenciál vycházející z fyzikálně-chemických vlastností; „mass balance“ studie založené na stanovování rozpustnosti a zavedení zjednodušení pro tenké střevo ve smyslu duté trubice; absorpce stanovovaná v kompartmentech, jako např. míchaná nádoba a absorpce z toho kompartmentu.

Některé fyzikálně-chemické vlastnosti mající vliv na rychlost a míru absorpce léčiv jsou diskutovány dále v kontextu vývoje nových léčivých přípravků (Li et al., 2005).

2.3.1.1. Rozpustnost

Léčivé látky v pevném skupenství se musí rozpustit předtím, než budou absorbovány. Rychlost disoluce je závislá na rozpustnosti účinné látky. Proto se stanovuje rozpustnost lékové formy spolu s obsahem aktivní látky. Johnson a Swindell (Johnson et Swindell, 1996) navrhli relativně jednoduchý postup jak stanovit maximálně absorbovatelnou dávku (MAD – maximum absorbable dose):

$$MAD = S \times K_a \times SIWV \times SITT$$

kde S je rozpustnost (mg/ml) při pH 6,5, K_a je konstanta rychlosti intestinální absorpce (min^{-1}), která byla získána z experimentů prováděných na potkaních intestinálních perfúzních modelech, a je považována za podobnou lidské K_a konstantě. SIWV je objem vody tenkého střeva (ml), ten má hodnotu 250 ml, SITT je čas, který stráví léčivo v tenkém střevě, obecně je roven třem hodinám. MAD koncept slouží k počátečnímu zjištění, zdali se vyskytnou nějaké potenciální potíže s disolucemi a absorpcí, a také dává možnost navrhnout

nějaké vhodné řešení např. použití speciálního výrobního procesu, aby byly potenciální rizika minimalizovaná. Dále pak rozpustnost v in vivo podmínkách GIT je funkcí koncentrace lipidů, surfaktantů a směsí micel vyskytujících se v intestinálních tekutinách a tento fakt může mít daleko větší souvislost s IV-IVC rozvahami. Pro látky jejichž $\log P > 3$ bylo doporučeno, aby se stanovovala rozpustnost a disoluční rychlost v podmínkách simulujících žaludeční a střevní tekutiny nebo v lidských GI aspirátech v rámci IV-IVC. Avšak u pravidelně in vitro požívaných médií pro stanovování kvality se nepoužívají média obsahující soli žlučových kyselin, lecitin nebo rozkladné produkty lipidového trávení. Pro příklad, když byla měřena rozpustnost danazolu ($\log P$ 4,5) bylo provedeno srovnání v tekutinách simulujících žaludeční tekutiny, střevní tekutiny a v lidských aspirátech. Rozpustnost v lidských aspirátech byla mnohem vyšší než v samotných pufrách. Právě když byly do pufrů přidány různé koncentrace solí žlučových kyselin, lecitinu a lauryl-sulfátu sodného, tak se výsledná rozpustnost velmi odlišovala v závislosti na původu a koncentraci přidaných komponent. Proto by se mělo brát v úvahu složení solventů v in vivo podmínkách při úvahách o stanovování rozpustnosti (Li et al., 2005).

2.3.1.2. pKa

Rozpustnost slabých kyselin nebo bází je závislá na jejich ionizačních konstantách a vnitřní rozpustnosti (S_0 ; rozpustnost jejich neionizované nebo ne-protonované formy). Z toho vyplývá, že rozpustnost je závislá na pH disolučního média. Jak pK_a tak i S_0 jsou důležitými faktory v předpovědi rozpustnosti v GI pH podmínkách. Relativně nízká pK_a kyselého léčiva nebo relativně vysoká pK_a bazického léčiva nezaručuje nutně vysokou rozpustnost v GI pH rozsahu, ledaže by vnitřní rozpustnost léčiva byla také vysoká. Účinné látky s hodnotami pK_a v rozmezí 1 – 8 podléhají značným změnám v rovnováhách mezi jejich ionizovanými a neionizovanými formami, když procházejí skrze různé části GITu, jejichž pH je různé. Např. disoluce bazické látky ketokonazolu při pH 6 je po 1 hodině pouze 10 %, zatímco při pH < 3 je více než 85 % rozpuštěno za méně než 5 minut. Tato pH závislost byla evidentní, když byl ketokonazol podán spolu s ranitidinem, kdy došlo ke zvýšení žaludečního pH na 6. C_{max} ketokonazolu se snížilo z 8,2 na 0,6 $\mu\text{g/ml}$ a AUC se snížila z 37,1 na 1,6

$\mu\text{g/h/ml}$. Podobně na tom bylo zjištění poklesu C_{max} o 85 % a AUC hodnot cinarizinu (bazické léčivo) u těch subjektů, jejichž gastrické pH je vyšší, při srovnání s těmi, kteří vykazují nižší pH v žaludku. Ačkoliv se často vychází z předpokladu, že bazická látka se dobře rozpouští v podmínkách žaludečního prostředí, tak tyto příklady poukazují na rozdíly v rozpuštěném množství, které mohou být závislé na takových faktorech jako je pH a čas strávený v žaludku nebo tenkém střevu. Jedna možnost jak zlepšit tuto situaci, bude diskutováno dál, je podávání báze ve formě soli. Většinou tomu odpovídá vyšší disoluční rychlost.

Existují i možnosti zásahů do struktury molekuly léčiva, aby bylo dosaženo optimální absorpce. Je možné také převést účinnou látku na proléčivo a zvýšit tak absorpci ionizované lipofilní molekuly (Li et al., 2005).

2.3.1.3. Tvorba solí

Obvykle soli kyselin nebo bází vykazují rychlejší stupeň disoluce než jejich volné kyseliny nebo báze za okolností změn pH a rozpustnosti v difúzní vrstvě na povrchu rozpouštějící se pevné látky. Existují i případy, kdy za určitých GI pH podmínek může mít volná báze rychlejší disoluci než její sůl. Např. Serajuddin a Jarowski (Serajuddin et Jarowski, 1985) provedli experiment, kdy volná báze phenazopyridinu při pH 1 vykazovala rychlejší disoluci než phenazopyridin hydrochlorid. Z důvodu rozsahu pH v GIT (1 – 7) byl pH-disoluční profil soli stále velmi dobrý i přes jeho horší disoluční vlastnosti při in vitro testování. Kvůli pH závislé rozpustnosti je pravděpodobné, že dojde u volné kyseliny nebo báze k precipitaci během disoluce soli za určitých pH podmínek v GIT. V závislosti na pK_a a rozpustnosti volné formy dochází jak k precipitaci formy volné kyseliny relativně za nízkého pH, tj. v žaludku, tak i při relativně vyšším pH ve střevu. Často se stává, že tzv. inovátoři použijí jinou sůl, tj. např. místo draselné soli sůl sodou. Existují důkazy o zvýšení výskytu nežádoucích vedlejších účinků po podání jiné soli aktivní látky. V tomto obecném příkladu došlo díky lepším disolučním vlastnostem léčivého přípravku ke zvýšení plazmatických hladin aktivní látky a tím se objevily častější nežádoucí účinky. Tento obecný příklad ukazuje, že je zapotřebí volit nejenom

správnou sůl ale také i vhodnou lékovou formu, aby bylo dosaženo optimálních plazmatických koncentrací a biologické dostupnosti. Pokud tedy nelze tvorbou soli dosáhnout lepší disolučních vlastností, tak se v zásadě použije forma volné kyseliny nebo báze (Li et al., 2005).

2.3.1.4 pH difúzní vrstvy

Efekt pH difúzní vrstvy byl zmíněn již výše ve vztahu k disoluci volné kyseliny a báze versus jejich soli. Takový efekt je také nutno brát v úvahu, když se stanovuje disoluční profil jedné určité formy (např. volné kyseliny) za různých pH podmínek. Bylo zaznamenáno pH difúzní vrstvy na povrchu rozpouštěných částic kyseliny benzoové, které bylo prakticky konstantně pohybovalo okolo pH 3, zatímco pH nepufrovaného roztoku se měnilo od 3 do 11, rychlost disoluce se také neměnila v tomto pH rozmezí nijak významně. Tento jev může být vysvětlen tzv. samo-pufrujícím efektem v difúzní vrstvě. Stejně tak hraje významnou roli kapacita disolučního média v modulaci pH mikroprostředí léčivé látky, a proto má také vliv na disoluční rychlost. Z poznatku uvedených v tomto odstavci je zřejmé, že po přidání různého množství kyselých nebo bazických komponent do lékové formy, bude docházet k ovlivňování disoluce léčivého přípravku na základě efektu pH difúzní vrstvy (Li et al., 2005).

2.3.1.5. Velikost částic

Autoři Amidon a kol. (Amidon et al., 1995) popsali koncept tzv. disolučního čísla D_n , ve vztahu k absorpci lze tento vztah definovat následovně:

$$D_n = t_{res}/t_{diss}$$

kde t_{res} znamená průměrný čas setrvání léčiva GIT a t_{diss} znamená čas potřebný k tomu, aby částice léčiva rozpustily. Čím vyšší je hodnota D_n tím lépe se léčivo absorbuje a maximální absorpce může být očekávaná, když je hodnota > 1 , tj. $t_{res} > t_{diss}$. Jak bude diskutováno dále, t_{res} je fyziologickým faktorem, který je zatěžko ovlivnitelný designem lékové formy. Praktickým způsobem jak zvýšit

hodnoty D_n je proto snížení hodnoty t_{diss} . Jedna z běžně používaných metod jak zvýšit rychlost disoluce je zredukování velikosti částic. Zredukováním velikosti částic se i zvýší jejich počet a tím také jejich celková povrchová plocha. Pro příklad, když je počáteční velikost částic $10\ \mu\text{m}$ v průměru a dosáhne se snížení částic na $3 - 4\ \mu\text{m}$ za pomoci mikronizace, což je také limitní velikost částic získaná za použití konvenčních mlecích metod. Díky tomu dochází k dvojnásobnému až třináásobnému zvýšení disoluční rychlosti. Toto tvrzení platí pouze za předpokladu, že nedošlo ke konverzi léčiva na amorfnní formu, která by mohla ještě více zlepšit disoluční rychlost, nebo nedošlo ke vzniku aglomerátů částic, které by mohly zredukovat disoluční rychlost (Li et al., 2005).

2.3.1.6. Polymorfismus

Od doby, kdy byl publikován článek o efektu polymorfních forem na absorpci chloramfenikolu z chloramfenikol-palmitátu, tak se velmi zvýšil zájem o tuto problematiku (Aguiar et al., 1967). V některých kruzích je tak pojem polymorfismus spojen s překážkami vyvstávajícími při snaze dosáhnout požadované biologické dostupnosti. Ve studii, která byla provedena s polymorfní formou B (Aguiar et al., 1967), byla zpozorována čtyřnásobně vyšší rozpustnost než polymorfní formy A, a biologická dostupnost v lidském organismu byla až 20krát vyšší. Autoři však nedokázali vysvětlit důvod takových velkých rozdílů v biologické dostupnosti. Zajímavý byl i fakt, že když podali lidským subjektům tři různé suspenze polymorfní formy B s různými velikostmi částic ($1, 5$ a $25\ \mu\text{m}$), tak nebyly pozorovány rozdíly v zjištěné biologické dostupnosti. Suspenze s $1\ \mu\text{m}$ částicemi byla „dobře dispergována“ protože obsahovala surfaktant, zatímco suspenze s 5 a $25\ \mu\text{m}$ částicemi byly „vysoce agregovány“ jelikož neobsahovaly surfaktant. Na podkladě toho, že částice s velikostí $1\ \mu\text{m}$ vytvoří zcela jednoznačně větší povrchovou plochu, a tudíž se budou i lépe rozpouštět se autoři domnívali, že suspenze budou mít rozdílné disoluční charakteristiky a tudíž i rozdíly v biologické dostupnosti budou zřetelné. Avšak žádný vliv na biologickou dostupnost tato studie neprokázala. Bylo shledáno, že polymorfní forma má daleko vyšší význam než velikost částic. V případě chloramfenikolu nelze toto zjištění generalizovat, protože chloramfenikol-palmitát prodělává ve střevě hydrolýzu a jako chloramfenikol se

pak vstřebává přes membránu. Tento proces pak komplikuje celkový obraz absorpce tohoto léčiva.

V nedávné době, bylo publikováno, že hodnoty rozpustnosti u polymorfních forem většiny léčiv publikovaných v literatuře se neliší o více než dvojnásobek, a žádný ze dvou polymorfních forem nevykazuje více než pětinasobný rozdíl v rozpustnosti (Pudipeddi et Serajuddin, 2005). Takový rozdíl více méně není z biofarmaceutického hlediska významný. Proto není zapotřebí přidávat na potenciálním vlivu polymorfní formy na biologickou dostupnost a riziko spojené s inter-konverzí v lékové formě během vývoje léčivého přípravku. Polymorfismus může mít vliv na fyzikální stabilitu a na výrobní parametry lékové formy, které je třeba řešit zvlášť. Co se týče konverzí z krystalické formy na formy amorfní, bylo uvedeno, že amorfní formy léčiv mohou vykazovat rozdíly v deseti až stonásobcích hodnoty sledovaných parametrů proti hodnotám krystalických forem (Hancock et Parks, 2000).

2.3.2. BIOFARMACEUTICKÉ VLASTNOSTI

2.3.2.1. Permeabilita léčiva

Kromě rozpustnosti a disolucí hraje permeabilita důležitou roli v absorpci léčiva po podání ústy. Transcelulární permeabilita (P_m) lipofilní látky je závislá na její rozpustnosti v lipidové vrstvě GI membrány a její relativní vodné rozpustnosti. Toto je definováno jako poměr difúzivity léčiva v membráně (D_m) a membránového rozdělovacího koeficientu (K_p) ke tloušťce membrány (L_m):

$$P_m = K_p D_m / L_m$$

Proto bude rozdíl permeabilit v membráně pro určitou látku závislý na fluiditě membrány a hodnotě rozdělovacího koeficientu léčiva.

Modely, které se používají ke stanovování permeabilit látek, jsou různé. Počínaje těmi jednoduchými a konče složitými. Ionizace molekuly léčiva, $\log P$, permeabilita v umělé vytvořené membráně, permeabilita měřená Caco-2

buňkami a další metody měření permeabilit v in vitro buněčných epiteliálních kulturách. Také se provádějí různé in situ živočišné perfúzní studie a studie v lidském jejunu. Obecně se látka považuje za vysoce permeabilní, když její absorpce je vyšší než 90 % (Li et al., 2005).

2.3.2.2. Stanovení permeability

Jak bylo diskutováno výše, tak fyzikální vlastnosti molekul léčiv jako ionizace, rozdělovací koeficient, PSA, atd. jsou dobrými indikátory permeability léčiva. Přesto je zapotřebí provádět experimentální stanovení permeability v biologických membránách. I když je celková permeabilita složená z těchto faktorů, stejně tak je složená i z dalších faktorů, jako jsou intestinální metabolismus ve střevu a střevní stěně, P-glykoprotein (P-gp), který umožňuje eflux atd. Některé z těchto metod budou diskutovány dále z pohledu jak jejich výhod, tak i nevýhod (Li et al., 2005).

2.3.2.2.1. In vitro modely

Permeabilita in vivo v lidském organismu může být předvídána za použití preklinických permeabilitních modelů, jako jsou např. in situ perfúze potkaního střeva, Caco-2 model a extrahované části střev v Ussingově komoře. Absorpční studie v buněčných liniích zahrnují transport léčiva skrz buněčnou monovrstvu, která se rozrůstá na pórovitým permeabilním filtru. Caco-2 buňky se získávají z lidského adenokarcinomu tlustého střeva a patří mezi nejvíce používané modely, díky jejich morfologickým a také funkčním podobnostem k intestinálním enterocytům. Buňky tvoří těsné spoje a různé transportéry a některé enzymy. Bylo prokázáno, že vlastní hodnoty permeability v Caco-2 modelech dobře korelují s absorpcí léčiv v lidském organismu, s výjimkou hydrofilních sloučenin, které jsou absorbovány paracelulární cestou. Absorpce je často podceňována, protože póry, které tvoří těsné spoje (tight junctions) v Caco-2 buňkách jsou menší než v lidském organismu. Stejně tak exprese buněčných transportérů může způsobit přecenění nebo podcenění přenašečem-zprostředkovaného transportu. Např. P-gp může být zastoupen ve větší míře, zatímco ostatní transportéry jsou downregulovány. Nevýhodou

takových to studií je také potenciál ztráty měřené látky, která může být díky vlivu fyzikálních sil navázána na použité plasty nebo se může zachytit ve filtrech, na které jsou nanášeny buněčné kultury (Persson, 2006).

2.3.2.2.1.1. In vitro biologické metody (Caco-2 buňky)

In vitro biologické metody mohou být zapojeny do procesu určování, zdali splňují požadavky na permeabilitu a stabilitu k tomu, aby mohly projít stěnou GIT a vstoupit do portální cirkulace. V porovnání s in vivo nebo in situ metodami jsou metody in vitro relativně snadnější. Mají dostatečnou propustnou kapacitu a spotřebovávají pouze malá množství vzorků. In vitro metody zabraňují komplikovaným operacím a samotná analýza vzorků a jejich odebírání je jednodušší. Ve většině případů mohou získané výsledky umožnit náhled do mechanismů permeace, jako např. přenašečem versus pasivní cestou zprostředkované permeace, transcelulární versus paracelulární dráhy, segmentové rozdíly ve střevech atp. (Li et al., 2005).

In vitro biologické metody obsahují: vezikuly kartáčového lemu, izolované střevní buňky, vmezeřené střevní váčky, vyšlechtěné buňky v up-take módu nebo v dvoukompartmentovém systému, difúzní komory obsahující intestinální tkáň zvířecího nebo lidského původu (Li et al., 2005).

Použití Caco-2 buněčných monovrstev v předpovědi intestinální absorpce bylo publikováno Arturssonem a Karlssonem. Tito autoři také poukázali na nesrovnalost údajů získaných z různých laboratoří; údaje nebyly přímo srovnatelné, ačkoli mohly být kvantitativně podobné (Artursson et Karlsson, 1991).

V posledních letech se v mnoha výzkumných oblastech zvýšilo používání epiteliálních buněčných linií docela významně, mezi nimi jsou Caco-2 a HT29. Rutinně se dnes buněčné linie kultivují jako monovrstvy na permeabilních filtrech kvůli studování transepiteliálního transportu léčiv. Nejvíce studií zjišťujících transport v monovrstvách použilo právě Caco-2 buňky. Caco-2 buňky se mají používat k vyšetřování, zdali dochází k aktivnímu nebo

pasivnímu transportu. Pokud je transport aktivní, zjišťuje se druh přenašeče, P-glykoprotein apod. Avšak lepší vztah k in vivo situaci je získán z údajů o léčivech, které jsou přenášeny pasivní transcelulární cestou. Ačkoli je pasivní transcelulární cesta méně permeabilní v buněčné monovrstvě než v in vivo v epitelu tenkého střeva, tak data doposud získána indikují, že selektivita této dráhy je srovnatelná s in vivo situací. Protože jsou takové transportní studie používající buněčné monovrstvy jednoduché k provedení a potřebují pouze malá množství léčiv, jsou velmi rozšířeny ve screeningu permeabilit u nových kandidátů na léčiva v počátečních stádiích vývoje.

Jednou nevýhodou Caco-2 buněčné linie je její neschopnost pro určování permeability látek, které jsou absorbovány paracelulárně. Caco-2 buňky se získávají z karcinomu tlustého střeva a mají těsnější mezibuněčné spojení než epitel tenkého střeva.

2.3.2.2.1.2. Caco-2 výsledky

Existují studie ukazující vztah mezi in vitro Caco-2 naměřenou permeabilitou a in vivo intestinální absorpcí v lidských subjektech za použití modelových léčiv. Jejich vztahy umožňují rozlišit mezi nízkou a vysokou permeabilitou léčiv.

Ve studii, která se zabývala permeabilitou sedmi β -blokátorů (Yang et al., 2007) byl použit stejný postup ke zjištění jejich permeabilit a rozpustností, který je navržen v BCS směrnici (FDA, 2000).

Permeabilita vybraných léčiv byla zjišťována „transportními“ studiemi používající Caco-2 buňky. Roztok na apikální straně je v přímém kontaktu s buněčným povrchem, protože Caco-2 buňky nemají mucinovou ochrannou vrstvu na této straně. Vliv pH prostředí může mít kritický vliv na membránu transportující léčivo. Jinak je tomu na basolaterální straně, kde je pH podobné fyziologickým podmínkám, tak jak je tomu ve střevu. Za fyziologických podmínek jsou hodnoty pH rovny 7,4, protože extracelulární tekutiny mohou vyměňovány sérem skrze stěny vlásečnic. Aby mohly být tyto podmínky

napodobeny, bylo aplikováno na apikální stranu v této studii apikální médium s pH 6,8 a na basolaterální stranu basolaterální médium s pH 7,4.

Aby léčivo bylo označeno jako léčivo s vysokou permeabilitou, musí vykazovat podíl absorbované frakce 90 % a více. Těto hodnotě odpovídají hodnoty vlastních permeabilit v Caco-2 buňkách $>15 \times 10^{-6}$ cm/s (Yang et al., 2007).

2.3.2.2.2. In vivo perfúzní modely

Lidské perfúzní techniky jsou rozděleny do otevřených, polootevřených a dvojitě balónkově uzavřených systémů a výpočet absorpce je založen na úbytku léčiva z takto odděleného segmentu. Tyto techniky mohou být použity ke studiu metabolismu v játrech, střevu, in vivo disolucích léčivých přípravků, v lokálních farmakologických studiích, absorpčních studiích zabývajících se stravou, ke zjišťování mechanismů různých gastrointestinálních nemocí, interakcí léčiv, interakcí léčiv a stravy, transportními mechanismy a intestinální sekrecí léčiv a endogenních látek (Persson, 2006).

2.3.2.2.2.1. Zvířecí perfúzní studie

Existuje mnoho technik, které byly vyvinuty k tomu, aby bylo možné překlenout propast mezi in vitro modely pro stanovování absorpce léčiv a zvířecími modely. Nejjednoduššími modely jsou izolované střevní smyčky, ve kterých se monitoruje úbytek léčivé látky, a ty nejsložitější jsou ty, kde se přímým zásahem udržují konstantní faktory, jako jsou prokrvení, obsah střev, permeabilita střeva apod. U těchto složitých modelů se střevo neextrahuje a tzn., že se měření provádí přímo in situ. Ale i když jsou tyto metody velmi sofistikované, tak přesto přesně nevystihují situaci v rámci celého zvířecího organismu, proto je někdy nutné zkoumat absorpci v celém zvířecím těle (Li et al., 2005).

2.3.2.2.2. Lidské perfúzní studie

Nejběžnějším způsobem jak měřit absorpci léčiv a biologickou dostupnost v lidském organismu je provádění farmakokinetických studií. Tyto přístupy jsou použity k vyhodnocování rychlosti a míry absorpce, ale nevystihují explicitně transportní stupeň průniku střevním epitelem (permeabilitu). Komplikovanější metody zahrnují různý stupeň intubačních technik s jednoduchou perfúzí části střeva, dálkově ovládané kapsle a farmakoscintigrafické studie (Li et al., 2005).

Pokusy zahrnující lidské subjekty lze nahradit např. pokusy na potkanech. Existuje totiž podobnost absorpce v určitém rozsahu, který je lineární. To je vysvětleno podobnou hodnotou absorpční konstanty. Proto také mohou být pokusy na potkanech určitou uspokojivou alternativou pro stanovování absorpce IR lékových forem nebo roztoků. Zřídka se používají i psi modely, ale jejich obecné korelace mezi lidským organismem dosahují podobnosti pouze $r^2 = 0,512$ ve srovnání s potkaními modely, jejichž korelace dosahují hodnot $r^2 = 0,97$ (Chiou, 1998).

2.3.2.3. Ionizace

Zjednodušeně řečeno převažuje up-take neionizované formy léčiva nad ionizovanou. Dalším faktorem, který pak ovlivní permeabilitu je K_p rozdělovací koeficient. Přes membránu pronikají molekuly léčiva pouze v neionizované formě. Jakmile se změní rovnovážná koncentrace ionizované a neionizované formy molekuly léčiva před vstupem do membrány, tak dochází k tomu, že se opět vytvoří nová rovnováha mezi oběma formami. Podle rovnice pro $pH_{max/2}$, která značí půl-maximální stupeň absorpce:

$$pH_{max/2} = pK_a \pm \log[1 + (P_m/P_{aq})]$$

kde P_{aq} = permeabilita z hraniční vodné vrstvy, P_m = permeabilita přes membránu, vyplývá absorpční profil lipofilních látek. Ten má sigmoidální tvar. Z

toho rovněž vyplývá, že poloviční maximální stupeň absorpce bude při hodnotách pH blízkých pKa. Při pH hodnotách, kdy bude molekula léčiva plně ionizována a přesto bude docházet k permeaci léčiva membránou, bude to znamenat, že molekula léčiva využívá jiné cesty prostupu membránou. Například póry nebo paracelulární transportní mechanismy (Li et al., 2005).

2.3.2.4. Rozdělovací koeficient

Membrána je tvořena dvěma skupinami substancí: lipidy a proteiny. Data získané za použití rentgenové difrakce ukazují, že fosfolipidy, které mají amfifilní charakter jsou uspořádány tak, že vytvářejí dvě paralelní vrstvy s polárními konci, které jsou orientovány směrem do vodného prostředí na každé straně membrány. Molekuly léčiv, které mají správné lipofilní charakteristiky, jsou schopny prostupovat membránou skoro ve stejném poměru, jako když prostupují mezi vodou a olejem. Olej-voda rozdělovací koeficient je široce používaným indikátorem lipofility, nabízející dobrý pohled na permeabilitu molekuly léčiva přes skutečnou membránu. Oktanol-voda rozdělovací koeficient neutrálních nebo neionizovaných forem je často uváděn jako P nebo $\log P$ a obvykle je použit ke srovnání různých molekul pro jejich schopnost procházet membránami z apikálního do basolaterálního směru absorpce. Provádění studií ke zjišťování rozdělovacího koeficientu při fyziologických hodnotách pH je považováno za nejlepší přístup k molekulám mající schopnost se ionizovat. Rozdělovací koeficient stanovený při pH 7,4 je rovněž nazván jako distribuční koeficient (D). Při pH 7,4 se současnou ionizací se používá tento koeficient ke zjišťování absorpce léčiva. Krämer (Krämer, 1999) pozoroval na 14 strukturně různých molekulách závislost, která měla tvar zvonovité křivky, mezi P_{app} (CACO-2) a $\log D$ při pH 7,4; molekuly s vysokou permeabilitou měly hodnoty $\log P$ mezi 0 až 3, a molekuly s nízkou permeabilitou měly hodnoty $\log P < -1,5$ nebo $> 4,5$. V roce 2004 provedli Kasim a kol. pokus s 29 molekulami léčiv, aby zjistili souvislost mezi hodnotami intestinální permeability ($\log P$), vypočítaném $\log P$ nebo $\log P$ v lidském organismu a $\log D$ při pH 6,5 (16 léčiv). Výsledek ukázal, že $\log D$ při pH 6,5 může být obecně použit jako předběžné měřítko pro permeabilitu molekul léčiv (Kasim et al., 2004).

2.3.2.5. Absorpční potenciál

Použitím hodnot logD při pH 6,5 a braním v potaz rozpustnost a dávku přišli Dressman a kol. (Dressman et al., 1985) s konceptem „absorpčního potenciálu“ (AP):

$$AP = \log (P \times F_{un} / D_0)$$

kde P je rozdělovací koeficient, F_{un} je frakce neionizované formy při pH 6,5 a D_0 je bezrozměrné číslo, které je definováno jako podíl koncentrace dávky a rozpustnosti. Ačkoli to nebere v potaz všechny procesy ovlivňující absorpci po per orálním podání léčivého přípravku, AP má výhody kombinující několik klíčových fyzikálně-chemických vlastností do jednoho parametru. V rámci testovaných látek se AP jeví tak, že silně koreluje s absorbovanou frakcí, a tak může být použit pro předběžné srovnání mezi látkami.

2.3.2.6. Polárně specifický povrch

Molekulární polárně specifický povrch (Polar surface area = PSA), nebo povrch molekuly připadající na polární atomy. Tato vlastnost molekul vykazuje dobrou korelaci s pasivním molekulárním transportem přes membrány, proto také tato vlastnost umožňuje předpovídat transportní vlastnosti léčiv.

2.3.3. Fyziologické faktory

Třetí důležitou složkou (komponentou) v celkovém procesu IV-IVC jsou fyziologické faktory GIT. Mohou limitovat jak rychlost, tak i míru absorpce. Proto každý vývoj lékových forem musí uvažovat s těmito faktory.

2.3.3.1. Obsah GIT

Vlastnosti žaludečního a střevního obsahu byly publikovány v literatuře. Tabulka ukazuje složení žaludečních a střevních tekutin. Dokonce i během lačnění je in vivo disoluce v lidském organismu komplexním a vysoce

specifickým procesem. Dominantním iontem v žaludečních šťávách jsou chloridy s koncentrací 102 ± 28 mmol/l a pak ve střevu jsou sodné a chloridové ionty. (Lindahl et al., 1997)

Tab. 2. Osmolalita, iontová síla a koncentrace různých složek žaludečních a lačnickových šťáv, které byly odebrány na lačno z více než 30 dobrovolníků (Lindahl et al., 1997)

		Žaludeční šťávy (n = 36)		Obsah lačnicku (n = 37)		
		průměr	±SD	průměr	±SD	
Osmolalita	mOsm/kg	191	36	271	15	<0,001
Iontová síla		0,1	0,025	0,139	0,014	<0,001
pH		2,9	1,97	7,1	0,6	<0,001
Na ⁺	mM	68	29	142	13	<0,001
K ⁺	mM	13,4	3	5,4	2,1	<0,001
Cl ⁻	mM	102	28	126	19	<0,001
Ca ²⁺	mM	0,6	0,2	0,5	0,3	0,01
Žlučové kys.	mM	0,2	0,5	2,9	2,9	<0,001
Bílkoviny	g/l	1,8	0,7	2,1	1,2	nevýznamn.

Pozn.: n, počet vzorků; p>0,05

2.3.3.2. Gastrointestinální pH

Žaludeční tekutiny vykazují velmi nízké hodnoty pH, medián těchto hodnot pH je 1,7, ale mohou se lišit v rozmezí 0,8 – 7,2. Současně s potravou je pH žaludečních tekutin pufrováno na méně kyselé hodnoty s mediánem 5,0 v závislosti na druhu a objemu potravy. Hodnoty pH se znovu ustalují po čase okolo dvou až tří hodin po příjmu potravy. Intestinální pH je podstatně vyšší než žaludeční a to kvůli neutralizační reakci mezi přicházejícími kyselinami a bikarbonátovými ionty, které jsou sekretovány z pankreatu. V tenkém střevě se pH hodnoty pohybují v rozsahu od 5,5 do 7,5. Obsah žaludku po příjmu potravy snižuje pH ve střevu na hodnoty mezi 5,1 a 5,4. Těsně vedle mukosy tenkého střeva je kyselá mikrovrstva, jejíchž tloušťka je cca 20 μm a hodnoty pH jsou přibližně o 0,5 jednotky nižší než celém objemu. V tlustém střevu rovněž

dochází kvůli bakteriální degradaci uhlovodíků ke snížení pH na hodnoty mezi 5,5 a 7. (Persson, 2006)

Po požití jídla dochází ke změnám hodnot v pH. Změny jsou mimo jiné způsobeny pufrovací schopností potravy. Změny v hodnotách pH mají vliv na rozpustnosti, disoluci, chemickou stabilitu a na vnitřní rozpustnost léčivých látek. Např. rozpouštění/disoluce slabě bazických léčiv je typicky větší v žaludku než ve střevu po příjmu potravy, ale pro slabě kyselá léčiva je tomu naopak. Rozpustnost/disoluce je v žaludečním prostředí minimální a zato v prostředí tenkého střeva se rychlost rozpouštění zvyšuje. Tak pokud bereme v potaz vlivu jídla na žaludeční pH, tak pokud po příjmu potravy dojde zároveň k podání léčivého přípravku, který má vlastnosti slabé báze, dojde k tomu, že se zpomalí disoluce/rozpouštění.

2.3.3.3. Tranzitní časy GIT

Hodnoty časů setrvání léčivého přípravku v žaludku, resp. ve střevu jsou důležitými faktory pro vhodné složení lékové formy. Zpravidla jsou dvě možnosti, co se týče podání/příjmu léčivého přípravku. Ve stavu na lačno je léčivý přípravek podáván spolu s tekutinou, která pak setrvává v žaludku přibližně jednu hodinu. Jídlo a jiné pevné složky způsobují, že se vyprazdňování žaludku zpomalí na přibližně dvě až tři hodiny, kdy se potrava po částech posouvá dál ve směru duodena a tenkého střeva. Potrava, resp. její kompozice z tuků, sacharidů a bílkovin stimuluje vylučování např. žlučových kyselin, pankreatických trávicích enzymů apod. Tyto všechny faktory přispívají k možnému urychlení absorpce. Obvyklý tranzitní čas tenkého střeva je v rozsahu tří až čtyř hodin (Davis et al., 1986).

2.3.3.4. Motilita GIT

Obecně je absorpce léčiva z žaludku minimální ve srovnání s absorpcí v tenkém střevě. Ale vyprazdňování žaludku je důležitým fyziologickým faktorem, který může ovlivnit jak množství, tak i míru up-take léčiva ze střeva. Během doby lačnění dochází ke střídavé aktivitě vyprazdňování žaludku.

Nepravidelné kontrakce následované pravidelnými kontrakcemi s vysokou amplitudou tlačí zbytkový obsah distálně a posouvají potravu dále do duodéna. V přítomnosti potravy jsou kontrakce žaludečního svalstva spíše nepravidelné, mající za úkol mixovat intestinální obsah a posouvat ho dále, vše ve směru tlustého střeva. Vyprazdňování žaludku je opožděno s tím, že tekutiny a částice menší než 2 mm jsou posouvány kontinuálně. Rychlost postupu potravy GIT je uváděn jako přibližně podobný jak během lačnění tak po příjmu potravy. Jeho hodnoty jsou 1,3 – 1,5 cm/min. Objemy intestinálních tekutin jsou během lačnění v žaludku 20 – 30 ml a 120 – 350 ml ve střevu a po příjmu potravy je objem značně variabilní a může dosahovat hodnot až 1600 ml (Persson, 2006).

2.3.3.5. IV-IVC lékových forem

Jakmile je díky principům IV-IVC dosaženo úspěšně navržené lékové formy, lze použít tyto postupy k náhradě in vivo testů. Naskytuje se pak i možnost podpory biowaiver žádostí.

2.4 BIOFARMACEUTICKÝ KLASIFIKAČNÍ SYSTÉM

2.4.1 První zmínky o BCS

V roce 1995 přišel Americký úřad pro zdraví lidu (American Department of Health and Human Services, U.S. Food and Drug Administration (HHS-FDA) s myšlenkou Biofarmaceutického klasifikačního systému, jehož záměrem bylo nabídnout biowaiver za přesně definovaných podmínek a tím pak zkrátit dobu potřebnou pro zaregistrování nových léčivých přípravků a zvýšit možnosti co se týče po-registračních změn (SUPAC) (FDA, 1995). Místo provádění nákladných a časově náročných in vivo studií může posloužit disoluční test k rozhodnutí, zdali jsou si testované produkty ekvivalentní. Na počátku byly biowaiver žádosti zamýšleny pouze pro SUPAC.

Před nějakou dobou byl rozšířen původní biowaiver koncept na určité generické léčivé přípravky, jejichž cesta podání je per os.

Hlavní výhodou schvalovací procedury pro biowaiver žádosti je zjednodušení registračního procesu a zkrácení časových intervalů u dílčích registračních kroků, a také i snížení výdajů k tomu, aby mohl být nový produkt uveden na farmaceutický trh.

2.4.2 Základy Biofarmaceutického klasifikačního systému

Biofarmaceutický klasifikační systém byl navržen v roce 1995 skupinou vedenou Amidonem a kol. (Amidon et al., 1995). BCS je vědecký projekt určený ke klasifikaci léčiv do určitých skupin podle jejich rozpustnosti ve vodném roztoku a intestinální permeabilitě. Když se spojí tyto data spolu s údaji o disolucích, tak získáme jejich farmakokinetický profil podávající údaje o rychlosti a rozsahu absorpce z IR pevné lékové formy podávané per os. Amidon a kol. patří mezi průkopníky v oblasti IV-IVC kladoucí důraz především na rozpustnost a permeabilitu látek.

Co se týče IR pevných lékových forem a jejich disolucí, tak jsou kategorizovány do dvou skupin: rychlá nebo pomalá rozpadavost. Podle svých vlastností jsou léčiva klasifikována do následujících čtyř tříd:

Tab. 3. BCS třídy

	rozpustnost	permeabilita
BCS třída I	vysoká	vysoká
BCS třída II	nízká	vysoká
BCS třída III	vysoká	nízká
BCS třída IV	nízká	nízká

V závislosti na zařazení je dostupnost aktivní látky po per orálním podání závislá rovněž na lékové formulaci a výrobní metodě. Jednotlivá kritéria pro určení rozpustnosti a permeability budou uvedeny v dalších kapitolách. Použité metody k určování permeabilit používají data změřené absorbované frakce, jelikož kdyby se měly použít údaje o biologické dostupnosti, docházelo by ke zkreslení výsledků vlivem first-pass efektu při průchodu játry. Rovněž HHS-FDA

navrhuje použít dvě různé metody k prokázání permeability, když se zdají být výsledky měření u jedné metody nespolehlivými.

2.4.3 Lékové formy, které mohou být za současných podmínek aplikovány postupem biowaiver žádosti podle FDA

- musí obsahovat aktivní látku třídy BCS I;
- léčivý přípravek se musí velmi rychle rozpouštět, 85% obsahu aktivní látky by mělo být uvolněno během 30 minut ve třech různých disolučních médiích (pH 1,2, pH 4,5 a pH 6,8; složení pufrů se nachází v „Multisource document“) (WHO, Annex 7, 2006) za použití USP I s košíčkem se 100 rpm nebo USP II s pádlem s 50 rpm při teplotě 37 °C a objemu 900 ml;
- nesmí obsahovat excipienty, které ovlivňují absorpci léčiva;
- nesmí obsahovat léčivo s úzkým terapeutickým indexem, např. lithium, jehož léková hladina musí být díky svému toxickému vlivu monitorována;
- design lékové formy nesmí být zamýšlen k absorpci z dutiny ústní.

Důvodem výše uvedených disolučních omezení je fakt, že když má látka vysokou rozpustnost i permeabilitu a uvolňuje se rychle, tak se podobá svým chováním roztoku v GIT. Složení léčivého přípravku je méně důležité v případě použití takových excipientů, které neovlivňují absorpci léčiva skrz střevní stěnu. Pokud má aktivní látka dobrou rozpustnost napříč pH spektrem, nebude podléhat precipitaci po rozpadnutí tablety. Vysoká permeabilita znamená kompletní up-take účinné látky (> 90 %) během pasáže tenkým střevem. Rychlá disoluce garantuje, že bude účinná látka po dostatečně dlouhou dobu dostupná pro up-take z GIT a potírá možné malé rozdíly mezi lékovými formami.

Léčivý přípravek obsahující účinnou látku s úzkým terapeutickým indexem by měl být vždycky testován za pomoci in vivo metod, protože se zde vyskytuje vysoké riziko k možnému ublížení pacientům a neměla by tak být použita žádost biowaiver.

Ukazuje se, že požadavky HHS-FDA na klasifikaci účinných látek a vhodnost kritérií pro použití biowaiver procedury jsou příliš striktní. Během posledních deseti let vzniklo několik publikací a zároveň se vede diskuse pro zmírnění původně HHS-FDA navržených kritériích pro aplikaci biowaiver. Tyto práce navrhují zmírnění podmínek s důrazem na vyšší dostupnost levnější léčby pro pacienty. Na základě těchto publikací a diskusí se WHO rozhodlo navrhnout upravení BCS kritérií a dodatečné úvahy pro vhodnost farmaceutických produktů pro biowaiver proceduru (WHO, Annex 8, 2006).

2.5. SMĚRNICE FDA PRO BCS (FDA, 2000)

2.5.1. BCS podle FDA

Tato směrnice zajišťuje doporučení pro sponzory, kteří se zabývají žádostmi pro vývoj nových léčiv, registrací nových léčiv, zkrácenou registrací nových léčiv a také tato směrnice obsahuje doplněk pro ty žadatele, kteří chtějí odpustit požadavek na stanovení in vivo biologické dostupnosti (BA) a/nebo bioekvivalence (BE) pro pevné, rychle se rozpadající (IR) lékové formy.

Existují určité rozdíly, které byly pozorovány v in vivo systémech, v rozsahu a rychlosti absorpce ze dvou farmaceuticky ekvivalentních přípravků. Tyto rozdíly byly způsobeny pravděpodobně různými disolučními profily v in vivo. Když je tedy in vivo disoluce IR pevné lékové formy dostatečně rychlá ve vztahu k vyprazdňování žaludku a látka má vysokou permeabilitu, tak rychlost a míra absorpce jsou nepochybně závislé na disolučním a/nebo gastrointestinálním čase. Za takových okolností by se nemusela stanovovat bioekvivalence nebo biologická dostupnost, v případě, že léčivo patří do BCS třídy I. Toto tvrzení platí do té doby, kdy neaktivní excipienty použité v lékové formulaci neovlivňují významným způsobem absorpci aktivní látky. Záměr BCS navrhován v tomto dokumentu platí pro ty žadatele o biowaiver, kteří se chtějí vyhnout studiím na stanovování BA nebo provádět BE-studie, jejichž aktivní látka patří do BCS třídy I a vykazuje rychlý disoluční profil podle doporučené testovací metody (21 CFR 320.22(e)).

2.5.1.1. Rozpustnost

Stanovení hranice určující zařazení do třídy rozpustnosti je založena na nejvyšší síle IR produktu, se kterým se žadatel o registraci uchází v žádosti o biowaiver. Léčivo získává označení vysoce rozpustné v případě, když největší síla se rozpustí v 250 ml nebo méně ml vodného média v rozsahu pH 1 – 7,5. Objem 250 ml byl převzat z protokolů typických BE-studií, kdy dobrovolník, který je na lačno, zapíjí lék jednou sklenicí vody (cca 8 uncemi tekutiny – 1 unce odpovídá 28,4 ml).

2.5.1.2. Permeabilita

Klasifikování léčiva v rámci permeability na permeabilitu vysokou nebo nízkou je založeno na rozsahu absorpce látky (absorbována frakce dávky, ne systémová BA) a přímo na měření rychlosti průchodu hmoty přes lidskou intestinální membránu. Alternativně mohou být použity jiné membránové systémy, mimo těch lidských, např. metody využívající in vitro epiteliální buněčné kultury. V případě, když neexistují důkazy vypovídající o látce, že je v GITu nestabilní, tak ji lze označit jako látku s vysokou permeabilitou, když je zjištěný rozsah absorpce v lidském organismu roven nebo vyšší 90 % z podané dávky. Toto měření je postaveno na určení rovnovážného rozsahu průchodu hmoty nebo na srovnání s intravenózně podanou srovnávací dávkou.

2.5.1.3. Disoluce

V této směrnici je určeno tak, že produkt je označen jako rychle se rozpadající, když se rozpadne 85 % stanovovaného množství v čase do 30 minut. Používá se přístroj popsáný v U. S. Pharmacopeia (USP). Typ I je nastaven na 100 otáček za minutu (nebo typ II nastaven na 50 ot./min) s objemem média 900 ml nebo méně s následujícími roztoky: (1) 0,1 M HCl nebo Roztok simulující žaludeční tekutiny (Simulated Gastric Fluid USP) bez

enzymů; (2) pufr 4,5 pH; (3) pufr 6,8 pH nebo Roztok simulující žaludeční tekutiny bez enzymů.

2.5.2. Doporučené metody určené ke klasifikování jednotlivých léčiv a určování jejich disolučních charakteristik

2.5.2.1. Určení rozpustnosti zkoušeného léčiva

Úkolem BCS je určení rovnovážné rozpustnosti léčiva za fyziologických podmínek. Profil rozpustnosti léčiva závislý na pH podmínkách je stanovován při teplotě 37 ± 1 °C ve vodném médiu s pH v rozsahu 1 – 7,5. Dostatečný počet stanovení při různých pH je úměrný profilu pH-závislosti daného léčiva a může vycházet z jeho ionizačních charakteristik. Například když pKa daného léčiva je v rozmezí 3 – 5, tak by se měla rozpustnost stanovovat při $\text{pH} = \text{pKa}$, $\text{pH} = \text{pKa} + 1$, $\text{pH} = \text{pKa} - 1$, a $\text{pH} = 1$ a 7,5. Tj. celkem při pěti různých hodnotách pH a minimálně tři opakovaná měření při jednom pH. Závisí také na variabilitě studie, pokud je variabilita vysoká, je doporučeno provést vícero měření, aby získané údaje o rozpustnosti měly vypovídající přesnost. Jako standardní pufrы se používají ty, které jsou uvedeny v USP. Pokud ale léčivo vykazuje nějaké známky chemické nestability, mohou se použít i jiné pufrы. Po přidání léčiva do pufrovaného média, by vždy mělo být ověřeno pH roztoku. Metody jiné než tradiční shake-flask (natřásaná baňka), jako např. kyselá nebo bazická titrace mohou být také použity ke stanovení rozpustnosti. Koncentrace léčiva ve zvolených pufrách se má stanovovat za použití ověřených stabilitu indikujících vzorků, které mají za úkol odlišit parentní látku od jejích degradačních produktů. V případě, že se vyskytly rozkladné reakce vlivem složení pufru a/nebo vlivu pH tak by se tento stav měl uvést do protokolu spolu s dalšími stabilitními údaji podle doporučení v kapitole 2.5.2.2.3. této práce.

Určení rozpustnosti se vypočítá z objemu vodného média, ve kterém se rozpustila nejvyšší síla léčiva. Léčivo získává označení vysoce rozpustné v případě, když největší síla se rozpustí v 250 ml nebo méně ml vodného média v rozsahu pH 1 – 7,5.

2.5.2.2. Určení permeability zkoušeného léčiva

Existují tři možnosti, jak získáme údaje o permeabilitě léčiva. Můžeme určovat absolutní biologickou dostupnost, intestinální perfúzi anebo použít metody typu „mass balance studie“ a to vše ve studiích na lidských subjektech. V případě, kdy se neprovádějí takové studie na lidech, jsou zde i jiné in vivo modely. Provádějí se tak in vivo nebo in situ studie intestinální perfúze na vhodných živočišných modelech (např. potkanech), anebo existují in vitro permeabilitní metody používající extrahované intestinální tkáně nebo monovrstvy vhodných epitelálních buněk. V mnoha případech poslouží jednoduchá metoda (např. když je absolutní biologická dostupnost podané látky 90 % a více, anebo 90 a více procent podané látky se vylučuje močí). Jakmile ale jednoduchá metoda selhává, musí se ke stanovení permeability použít dvě různé metody. Obecně se má za to, že chemická struktura a určité fyzikálně-chemické atributy látky (např. rozdělovací koeficient ve vhodných systémech) mohou podat užitečné informace o vlastnostech permeabilit. Tyto extra údaje mohou sponzoři zahrnout do dokumentace ke klasifikaci látek jako další podpůrné údaje.

2.5.2.2.1. Farmakokinetické studie na dobrovolnících

Mass balance studie

Farmakokinetické mass balance studie používají neznačené stabilní izotopy nebo radioaktivně značené léčiva ke zjišťování rozsahu absorpce. Závisí na variabilitě studie, ze které se pak vypočítá dostatečný počet subjektů k tomu, aby získané údaje o permeabilitě měly vypovídající hodnotu. Protože tato metoda produkuje vysoce variabilní výsledky u mnoha stanovovaných léčiv, tak proto se preferují metody uvedené níže.

Studie zjišťující absolutní biologickou dostupnost (BA)

Lze použít ke zjištění biologické dostupnosti porovnáním per os podaného léčiva s intravenosním podáním. Závisí na variabilitě studie, ze které se pak vypočítá dostatečný počet subjektů k tomu, aby získané údaje o permeabilitě měly vypovídající hodnotu. V případě, že je výsledek absolutní biologické dostupnosti 90 a více procent, nejsou zapotřebí další údaje, které dokumentují stabilitu léčiva v gastrointestinální tekutině.

2.5.2.2.2. Metody k určení intestinální permeability

Následující metody se mohou používat k určování permeability léčiva v gastro-intestinálním traktu: (1) in vivo intestinálně-perfúzní studie v lidském organismu; (2) in vivo nebo in situ intestinálně-perfúzní studie v živočišných modelech; (3) in vitro permeační studie používající extrahované lidské nebo živočišné intestinální tkáně; (4) in vitro permeační studie napříč monovrstvou kultivovaných epiteliálních buněk.

In vivo nebo in situ zvířecí modely a in vitro metody jako ty, které používají kultivované monovrstvy zvířecích nebo lidských epiteliálních buněk, jsou považovány za vhodné pro léčiva, která využívají pasivní transport k průniku membránami. Pozorovaná nízká permeabilita některých léčiv v lidském organismu může být způsobena efluxem léčiv přes membrány za pomoci přenašečů jako je P-glykoprotein (P-gp). Když ale v těchto modelech chybí efluxní přenašeči nebo jejich stupeň exprese je nízký ve srovnání s lidským organismem, tak to může mít vyšší pravděpodobnost špatného zařazení a určení permeability léčiva, které je efluxem transportováno zpět z membrány než v porovnání s léčivy, které jsou transportovány pasivním mechanismem. Expese známých transportérů efluxního systému ve vybraných studiích by měla být známa. Funkčnost exprese efluxního systému (např. P-gp) může být demonstrována za použití technik jako je obousměrná transportní studie. Tato studie demonstruje vyšší stupeň transportu ze směru basolaterálně-apikálního spolu se srovnáním ze směru apikálně-basolaterálního za použití vybraného modelového léčiva nebo chemické látky

v koncentracích, které nesaturují efluxní systém (např. cyclosporin A, vinblastin, rhodamin 123). V současné době (rok 2000) nemůžou být přijatá kritéria pro akceptování intestinálních efluxních studií. Namísto toho daná směrnice doporučuje omezení používání jiných než lidských permeabilitu testovacích metod pro léčiva, která jsou transportována pasivními mechanismy. Farmakokinetické studie zabývající se linearitou nebo proporcionalitou dávky mohou nabídnout užitečné informace pro vyhodnocení důležitosti pozorovaného in vitro efluxu léčiva.

Pro aplikaci BCS může být použit mechanismus pasivního transportu za situace, kdy je dodržena jedna z následujících podmínek.

- Je dodržen lineární vztah (farmakokinetický) mezi dávkou (např. příslušný rozsah klinické dávky) a naměřenou biologickou dostupností (AUC – plocha pod křivkou) v lidském organismu.
- Jestliže neexistuje závislost in vivo nebo in situ permeability naměřené ve zvířecím modelu na počáteční koncentraci léčiva (např. 0,01, 0,1 a 1krát tak velká nejvyšší síla rozpouštěná v 250 ml) v perfúzní kapalině.
- Jestliže neexistuje závislost naměřené in vitro permeability na počáteční koncentraci léčiva (např. 0,01, 0,1, a dvojnásobnou nejvyšší silou rozpuštěné v 250 ml) v donorové tekutině a ve směru transportu (např. není statisticky významný rozdíl v rychlosti transportu mezi apikálně-basolaterálním a basolaterálně-apikálním směrem pro tyto vybrané koncentrace léčiva) za použití vhodné metody s in vitro buněčnou kulturou, u které je známá exprese efluxních transportérů (např. P-gp)

Aby bylo možné ověřit pravdivost permeačních metod, které jsou zamýšlené pro aplikaci BCS, je zapotřebí uvést vztahy mezi hodnotami permeability testovaného léčiva a údaje o absorpci léčiva v lidském organismu by měly být získány za použitím dostatečného počtu modelových léčiv. Pro in vivo intestinální perfúzní studie v lidském organismu je doporučeno šest léčiv. Pro in vivo nebo in situ intestinální perfúzní studie na zvířatech a pro in vitro

metody používající buněčné kultury je doporučeno dvacet léčiv. V závislosti na variabilitě studie musí být vybrán dostatečný vzorek subjektů – lidí, zvířat, extrahovaných tkání nebo buněčných monovrstev, aby byla zajištěna odpovídající kvalita výsledků. Tento vztah by měl dovolit přesné/jemné rozdělení léčiv s nízkou nebo vysokou intestinální permeabilitou.

Pro znázornění vhodné metody by měly mít léčiva různý rozsah absorpce: nízká (např. < 50 %), střední (např. 50 – 89 %) a vysoká absorpce (více než 90 %). Sponzoři si můžou zvolit ze seznamu léčiv a chemických sloučenin v příloze A nebo jinou látku, pro kterou existuje informace o mechanismu a rozsahu absorpce v lidském organismu.

Po důkazu vhodnosti metody a dodržení stejného protokolu studie, není zapotřebí re-testovat všechny modelové látky v následné studii pro zjištění absorpce pro testované léčivo. Místo toho se pak tyto modelové látky, které mají jak nízkou tak i vysokou permeabilitu použijí jako vnitřní standardy (např. se přidají do perfúzní tekutiny spolu s přídatkem stanovované látky). Tyto vnitřní standardy jsou přídatkem do objemu tekutiny (může se přidat i takový vnitřní standard, který vykazuje nulovou permeaci, např. PEG 4000). Výběr vnitřního standardu závisí na kompatibilitě s testovaným léčivem (např. neměly by vykazovat významné fyzikálně-chemické nebo permeační interakce). Když není možné postupovat podle tohoto protokolu, provádí se testování odděleně, ale ve stejném systému. Tj. ve stejných subjektech, zvířatech, tkáních, monovrstvách apod. Hodnoty permeability dvou vnitřních standardů by se neměly významně lišit v různých případech testování, včetně těch, které byly použity k důkazu vhodnosti dané metody. Po ukončení in situ nebo in vitro zkoušek je zapotřebí stanovit celkové množství látky, která se nachází v membráně.

Pro danou testovací metodu za přesně nastavených podmínek je lépe vybrat takový vnitřní standard, který bude mít jak nízkou nebo vysokou hodnotu permeability s hodnotou blízko hranici pro určení nízké/vysoké permeability, aby bylo usnadněné stanovení třídy permeability u testované látky. Pro vysvětlení, když testované léčivo je zařazeno mezi látky s vysokou

permeabilitou a to v případě, že naměřená permeabilita se shoduje nebo je vyšší než permeabilita zvoleného standardu s vysokou permeabilitou.

2.5.2.2.3. Nestability v GIT

K určení rozsahu absorpce v lidském organismu založeném na mass balance studiích měřících celkovou radioaktivitu ve vzorcích moči nebere v potaz rozsah degradace léčiva v gastro-intestinální tekutině, ještě před prostupem intestinální membránou. Navíc některé metody určující permeabilitu mohou být založeny na úbytku nebo clearance léčiva z perfúzních tekutin v lidském a/nebo zvířecím gastro-intestinálním traktu, jak in vivo nebo in situ. Změřením úbytku léčiva z gastro-intestinální tekutiny dostaneme kvalifikovanější výsledek než změřením permeability léčiva přes intestinální membránu ovlivněného degradačními procesy již ve zmíněné tekutině. Ověření stability léčiva v gastro-intestinálním traktu lze provést za použití získaných intestinálních tekutin z lidských subjektů. Roztok léčiva se inkubuje při 37 °C po dobu, která je poměrná k době kontaktu léčiva v in vivo podmínkách (např. 1 hodina v prostředí žaludečních šťáv a 3 hodiny v prostředí simulující podmínky střeva). Koncentrace léčiva se stanovuje za použití validovaných stabilitu-indikujících metod. Významná degradace léčiva vyšší než 5 % znamená podle tohoto protokolu potenciální nestabilitu. K získávání gastro-intestinálních tekutin je zapotřebí intubace lidských subjektů, to může být v některých případech problematické. Mohou se použít i gastro-intestinální tekutiny ze zvířecích modelů, anebo simulované tekutiny popsané v USP, v případě, že jsou správně vytvořeny.

2.5.2.3. Zjišťování disolučních charakteristik a podobností disolučních profilů

Disoluční testy by měly probíhat podle USP Apparatus I při 100 rpm nebo Apparatus II při 50 rpm s 900 ml následujících disolučních medií: (1) 0,1 M HCl nebo Roztok simulující žaludeční tekutiny (Simulated Gastric Fluid USP) bez enzymů; (2) pufr 4,5 pH; (3) pufr 6,8 pH nebo Roztok simulující žaludeční tekutiny bez enzymů. Avšak pro hodnocení želatinových kapek nebo želatinou

obalených tablet se může použít roztok podle USP obsahující žaludeční enzymy.

Přístroje určené k testování disolučních charakteristik používané ke stanovení permeabilit v kontextu této kapitoly jsou uvedeny a popsány v USP kapitole (<711>Dissolution). Výběr testovacího disolučního přístroje (USP Apparatus I nebo II) během vývoje léčiva by měl být založen na srovnání in vitro disolucí a in vivo farmakokinetických údajů dostupných pro farmaceutický produkt. USP Apparatus I (košíčková metoda) je obecně preferován pro kapsle a ty produkty, které mají tendenci plavat na hladině a USP Apparatus II (pádlová metoda) je obecně používán pro tablety. Pro některé tabletové lékové formy se může jevit in vitro (ale ne in vivo) disoluce pomalejší kvůli tomu, že tableta usedá na dno nádoby. V takových situacích je preferován USP Apparatus I před USP Apparatus II. Pokud je zapotřebí upravit testovací podmínky, aby se přiblížily rychlé in vivo disoluci lékové formy (např. použití jiné rotační rychlosti), takové modifikace musí být ověřeny srovnáním in vitro disolucí s in vivo absorpčními údaji (např. provedení relativní BA-studie za použití jednoduchého vodného roztoku jako referenčního produktu).

Minimálně je požadováno 12 dávkových jednotek léčivého přípravku podpoře žádosti biowaiver. Vzorky by měly být sbírány v dostatečném počtu intervalů, aby byl disoluční profil dostatečně charakterizován (např. 10, 15, 20 a 30 minut).

Když srovnáváme testovaný a referenční produkt, tak se disoluční profily srovnávají faktorem podobnosti (f_2). Faktor podobnosti je reciprokou mocninou logaritmičnou rovnicí vycházející ze součtu kvadratické chyby a je míra podobnosti v procentech (%) mezi dvěma disolučními křivkami.

$$f_2 = 50 * \log \{ [1 + (1/n) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2]^{-0,5} * 100 \}$$

Dva disoluční profily jsou si podobné, když f_2 hodnota je ≥ 50 . Aby bylo možné použít průměrné hodnoty, tak koeficient variability nesmí překročit 20 % v počátečních fázích procesu disoluce (např. desátá minuta) a nesmí být více

než 10 % v každém bodě stanovení. V případě, že se testovaný i referenční produkt rozpadnou z 85 % do doby ≤ 15 minut ve všech třech disolučních mediích, která byla uvedena dříve, tak není třeba provádět srovnávání profilů použitím f_2 faktoru.

2.5.3. Rozšiřující úvahy pro aplikování biowaiver

Když se aplikant rozhodl obejít in vivo BA/BE-studii na základě BCS pro IR pevné per os administrované lékové formy, musí zvážit další faktory, které mohou negativně ovlivnit žádost nebo dokumentaci k jejich požadavku.

2.5.3.1 Excipienty

Excipienty mohou někdy ovlivnit rychlost a množství absorpce léčiva. Všeobecně se má za to, že excipienty obsažené v IR pevných per os podávaných lékových formách současně registrované FDA, neovlivňují míru ani rozsah absorpce u látek s vysokou rozpustností a permeabilitou, které jsou formulované jako rychle se rozpadající produkty. Aby bylo možné podpořit biowaiver žádost, měla by být kvantita excipientů v IR léčivém přípravku konzistentní se zamýšlenou funkcí (např. kluzné látky). Když se v léčivém přípravku nachází atypický větší podíl běžně používaného excipientu, požaduje registrační autorita dodatečně zdokumentované informace (např. BA-studii), zda-li dané množství neovlivňuje biologickou dostupnost. Jeden ze způsobů, jak získat takové informace je provést relativní BA-studii za použití prostého vodného roztoku jako reference. Větší kvantita určitého excipientu jako např. surfaktanty (např. polysorbát 80) a chuťová korigencia (např. manitol nebo sorbitol) mohou způsobit problémy a žadatelé jsou žádáni, aby provedli rešerši na tyto faktory.

2.5.3.2. Proléčiva

Permeabilita proléčiv bude záviset na mechanismu a na (anatomickém) místě konverze. Když se přeměňuje proléčivo na účinnou látku až po přestupu intestinální membránou, je třeba stanovovat permeabilitu

proléčiva. Když tato konverze nastává dříve, než prochází membránou, tak je třeba stanovovat permeabilitu účinné látky. Údaje o pH závislé rozpustnosti a disolucích mohou být důležitým faktorem. Žadatelé by si měli uvědomit před tím, než budou žádat prominutí dělat BE-studii, že je třeba udělat rešerši ve spojitosti s BCS a permeabilitou proléčiva.

2.5.3.3. Výjimky, kdy nelze aplikovat biowaiver

Nelze aplikovat biowaiver na základě BCS v následujících případech:

Když má léčivo úzké terapeutické rozmezí. Tato směrnice definuje léčivo s úzkým terapeutickým rozmezím, jako konkrétní léčivo, které podléhá monitorování lékových hladin nebo farmakodynamickému účinku a/nebo léčiva, která byla označena jako „léčiva s úzkým terapeutickým rozmezím“. Např. digoxin, litium, fenytoin, teofylin a warfarin. Ale protože ne všechna léčiva podléhají monitorování lékových hladin nebo monitorování farmakodynamického účinku, je zapotřebí vypracovat patřičné rešerše, jestli dané léčivo spadá do zmiňované kategorie či nikoli.

Léčivé přípravky vytvořené a zamýšlené k absorbování z ústní dutiny. Biowaiver žádost pro tyto léčivé přípravky, jako jsou sublinguální nebo bukální tablety, není možná.

2.5.4. Aplikování BCS regulačními autoritami

2.5.4.1. IND/NDA

IND (investigational new drug application) = žádosti pro výzkum nových léčiv

NDA (new drug applications) = žádosti pro nová léčiva

Evidence demonstrující in vivo biologickou dostupnost nebo informace k tomu, aby FDA povolila obejít tyto fakta, musí být zahrnuta v NDAs (21 CFR 320,21(a)). Existuje určitý záměr ke zjištění in vivo chování lékové formy (dosage form) použité v klinických studiích, které již primárně zajistily evidenci o

účinnosti a bezpečnosti. Sponzor si může přát určení relativní biologické dostupnosti IR pevné lékové formy srovnáním s orálním roztokem, suspenzí nebo intravenózní injekcí (21 CFR 320.25 (d)(2) a 320.25 (d)(3)). Biologická dostupnost lékové formy použité v klinické studii by měla být optimalizována již během vývoje nového léčiva.

Jakmile je stanovena in vivo biologická dostupnost dané lékové formy během vývoje nového léčiva, tak se mohou provést následující hlavní změny za použití BCS. Jsou to změny v jednotlivých složkách, složení a/nebo výrobních metodách (např. podobné k SUPAC-IR Level 3 changes). Biowaiver založený na BCS je aplikovatelný na léčivé přípravky, které jsou připravené k registraci a distribuci na trh, když jsou změny, např. ve složení, v jednotlivých složkách nebo výrobním procesu provedeny na klinické šarži během klinické studie a to do té doby pokud vykazují rychlou rozpadavost a podobné disoluční profily (viz kapitoly 2.5.1. a 2.5.2. této práce). Tento záměr je užitečný pouze, když má dané léčivo vysokou rozpustnost a permeabilitu (BCS třída I) a lékové pre- a postformulace jsou farmaceuticky ekvivalentní (na základě definice v 21 CFR 320.1 (c)). Biowaiver využívající BCS je určen pouze pro BE-studie. Nelze je aplikovat na BA-studie porovnávací vliv jídla nebo jiné farmakokinetické studie.

2.5.4.2. ANDA - zkrácená registrace nových léčiv

O biowaiver založený na BCS může být požádáno u IR lékových forem obsahující léčivo, které patří do BCS 1. S tím, že i referenční produkt se rychle rozpadá a testovaný produkt vykazuje podobné disoluční profily k referenčnímu produktu (viz kapitoly 2.5.1. a 2.5.2. této práce). Tento záměr je použitelný, když jsou referenční lékové formy s testovanými farmaceuticky ekvivalentní. Výběr disolučního přístroje (USP Apparatus I nebo II) by měl být totožný jako ten, který byl použit ke stanovení referenčního produktu.

2.5.4.3. Poregistrační změny

O biowaiver založený na BCS může být požádáno i pro významné poregistrační změny (např. změny třetího stupně ve struktuře a složení) u rychle

se rozpadajících IR produktů, obsahujících účinnou látku z BCS-třídy 1, kdy po úpravě zůstává disoluce stále rychlou a oba změněné produkty, jak před tak po, vykazují podobné disoluční profily (viz kapitoly 2.5.1. a 2.5.2. této práce). Tento záměr může být proveden pouze, když si jsou tyto produkty v obou případech farmaceuticky ekvivalentní.

2.5.5. Data, která podporují biowaiver žádosti

Léčivo, na které se uplatňuje žádost biowaiver by mělo mít vysokou permeabilitu a rozpustnost. Žadatele podávající žádosti biowaiver na základě BCS by měli postoupit následující informaci kancelářím pro řešerše na oddělení klinické farmakologie a biofarmaceutiky (pro tzv. NDA) nebo oddělení generických léčiv – divizi zabývající se bioekvivalenci (pro tzv. ANDA).

2.5.5.1. Data podporující vysokou rozpustnost

Data podporující vysokou rozpustnost testovaného léčiva by měly být zjištěny (viz kapitola 2.5.1.1. této práce). Následující informace by měly být obsaženy v žádosti:

- Popis testovacích metod, obsahující informaci o analytické metodě a složení pufrůvých roztoků;
- informaci o chemické struktuře, molekulové hmotnosti, druhu léčiva (kyselina, báze, amfoterní nebo neutrální molekula) a disociačních konstantách (pKa);
- Výsledky testů (průměry, standardní odchylky, koeficienty variability) sumarizované do tabulek seskupených podle pH roztoku. Rozpustnost léčiva (např. mg/ml) a objem média potřebný k rozpuštění největší lékové síly;
- Grafické znázornění pH závislého profilu rozpustnosti léčiva.

2.5.5.2. Data podporující vysokou permeabilitu

Data podporující vysokou permeabilitu testovaného léčiva by měly být zjištěny (viz kapitola 2.5.1.2. této práce). Následující informace by měly být obsaženy v žádosti:

- Pro farmakokinetické studie na lidech - informace o designu studie a používaných metodách spolu s farmakokinetickými daty
- Pro metody stanovující přímou permeabilitu – informace podporující vhodnost vybrané metody zahrnující popis metody použité ve studii, kritéria pro výběr lidských subjektů, zvířat nebo epiteliální buněčné kultury, koncentraci léčiva v donorové tekutině, popis analytické metody, metodu použitou ke kalkulaci rozsahu absorpce nebo permeability, a kde je zapotřebí, tak i informaci o efluxním potenciálu (např. údaje o obousměrném transportu)
- Seznam vybraných modelových léčiv spolu s údaji o rozsahu absorpce v lidech (průměr, standardní odchylka, koeficient variability), který je použit pro stanovení vhodnosti metody, pro stanovení hodnot permeability pro každé modelové léčivo (průměr, standardní odchylka, koeficient variability), pro třídu permeability každého modelového léčiva a nákres (křivka, graf) rozsahu absorpce jako funkce permeability (průměr \pm standardní odchylka nebo 95 % konfidenční interval) s identifikací nízké/vysoké hranice třídy permeability a vybraný vnitřní standard. Informace k podpoře vysoké permeability testovaného léčiva by měla zahrnovat permeabilitní data testované substance, vnitřních standardů (průměr, standardní odchylka, koeficient variability), údaje o stabilitách, a tam kde je zapotřebí se uvedou i údaje podporující pasivní transportní mechanismy a metody použité k určení vysoké permeability testované substance.

2.5.5.3. Data podporující rychlou a podobnou disoluci

Pro předložení žádosti o biowaiver se musí daný léčivý přípravek rychle rozpadat/rozpouštět. Údaje podporující rychlou disoluci testovaného a referenčního produktu musí být zjišťovány (viz kapitola 2.5.1.3. této práce). Následující informace by měly být obsaženy v žádosti:

- Krátký popis použitého IR produktu v disolučních testech zahrnující informace o šarži a vyrobeném množství, expiračním datu, rozměrech, síle a váze;
- Disoluční data se získávají z 12 individuálních měření testovaného a referenčního produktu za použití doporučených testovacích metod v části 2.5.2.3. této práce. Uvádí se procento rozpuštěného obsahu v každém jednotlivém měřeném časovém intervalu pro každou jednotlivou dávku. Průměrná procenta rozpuštěného produktu, rozmezí (nejvyšší a nejnižší) rozpuštění, a koeficient variability (relativní standardní odchylka) by měly být uvedeny v tabulkách. Také by měly být připojeny grafické znázornění disolučních profilů testovaného a referenčního produktu ve třech disolučních médiích;
- Údaje podporující podobnost disolučních profilů mezi testovaným a referenčním produktem v každém jednom ze tří disolučních médií používající f_2 výpočetní faktor.

2.5.5.4. Doplňkové informace

Výrobní proces použitý k vyrobení testovaného produktu by měl být v krátkosti popsán, aby tak podal informaci o výrobní metodě (např. vlhká granulace vs. přímé lisování). V žádosti by se taky měly vypsát použité excipienty a jejich množství, rovněž i jejich zamýšlené funkce. Excipienty použité v testovaném produktu by měly být již dříve použité a schválené FDA pro IR lékové formy.

2.5.5.5. Příloha „A“ směrnice FDA

Tato příloha zahrnuje seznam navržených modelových léčiv ke stanovování vhodnosti metod stanovujících permeabilitu, které byly popsány v kapitole 2.5.2. Permeabilita těchto sloučenin byla zjištěna na základě údajů dostupných FDA. Byly rovněž identifikovány potenciální vnitřní standardy (IS) a substráty efluxní pumpy (ES).

Tab. 4. Seznam modelových léčiv pro stanovení permeability

Léčivo	Třída permeability
Antipyrin	vysoká (potenciální IS kandidát)
Kofein	vysoká
Carbamazepin	vysoká
Fluvastatin	vysoká
Ketoprofen	vysoká
Metoprolol	vysoká (potenciální IS kandidát)
Naproxen	vysoká
Propranolol	vysoká
Theofylin	vysoká
Verapamil	vysoká (potenciální IS kandidát)
Amoxicillin	nízká
Atenolol	nízká
Furosemid	nízká
Hydrochlorothiazid	nízká
Mannitol	nízká (potenciální IS kandidát)
α -Methyldopa	nízká
Polyethylen glycol (400)	nízká
Polyethylen glycol (1000)	nízká
Polyethylen glycol (4000)	nízká (marker nulové permeability)
Ranitidin	nízká

2.6. EMEA KONCEPT Z ROKU 2007

Sekce 5.1.1. dokumentu EMEA „Note for Guidance on the Investigation of Bioavailability and Bioequivalence“ (EMEA, 2000) popisuje základní kritéria, kterých musí být dosaženo vztahem k aktivní látce a léčivému přípravku, aby žadatel mohl podat biowaiver žádost. Směrnice je koncipována k předcházení terapeutických chyb a možných problémů s dokazováním bioekvivalence, s respektem k aktivní látce, což je považováno a obtížně definovatelné jako

nespecifická žádost registrační žádost a zároveň to přináší překážky s patřičným zařazením v daných dokumentacích. Ačkoli se zmiňuje pojem vysoká permeabilita ve spojitosti s BCS konceptem, lineární a úplná absorpce je uvažována jako výhodnější farmakokinetická vlastnost. I přes všechny současné diskuse o rozšíření pro žadatele o biowaiver je rozpustnost aktivní látky tím hlavním limitujícím faktorem. Co se týče např. výzkumu in vitro disolucí nebo vyhodnocování vlivu excipientů u léčivých přípravků, tak směrnice k tomuto tématu přistupuje mírněji. Omezení evropské směrnice vedou žadatele (aplikanty) k tomu, aby se drželi směrnice FDA pro biowaiver, která je založena na BCS. Toto pak vede k nutnému výzkumu v oblasti buněčných kultur. Na druhé straně neexistuje na území EU harmonizované hodnocení biowaiver žádostí založené na BCS ze strany regulačních úřadů a dokonce dochází k zamítnutí těchto žádostí (EMEA, 2007).

2.6.1. WHO revidovaná kritéria pro BCS klasifikaci

2.6.1.1. WHO definice vysoké rozpustnosti (solubility)

Když účinná látka vykazuje poměrnou hodnotu dávka:rozpustnost 250 ml nebo nižší v pH rozmezí 1,2 až 6,8, tak může být klasifikována jako látka „vysoce rozpustná“. Snížení hodnoty pH ze 7,5, která je uvedena ve směrnici FDA na 6,8 ve WHO návrzích odráží fakt, že se léčivo rozpustí dříve, než dosáhne středního lačnicku (jejuna). Léčivo se pak zaručeně může vstřebávat, když je rozpuštěno.

Dále dávka, která je použita k výpočtu, je dávka, která je indikována WHO v modelovém seznamu základních léčiv (EML – Model list of essential medicines) (WHO, 2007). V některých zemích mohou existovat rozdíly v nejvyšších silách, tj. nejvyšší síly mohou být překročeny. V takových případech je zapotřebí přehodnotit poměrnou hodnotu dávka:rozpustnost i permeabilitu takového léčivého přípravku.

2.6.1.2. WHO definice permeability

Když je aktivní látka absorbována minimálně z 85 % nebo více, pak je označena jako látka s „vysokou permeabilitou“. Kritérium 90 % stanovené FDA směrnicí bylo sníženo na 85 % podle WHO. Některé aktivní látky mohou být nově zařazeny do BCS třídy I. Jsou mezi nimi léčiva jako paracetamol, acetylsalicylová kyselina, allopurinol, lamivudin a promethazin (WHO, Annex 8, 2006).

Aplikace těchto přehodnocených kritérií změnilo zařazení některých léčiv v seznamu.

2.6.1.3. WHO rozšíření oblasti pro aplikování biowaiver žádosti

V tzv. „Multisource document“ WHO rozšířilo oblast pro aplikaci biowaiver žádosti ve třech směrech:

- Kritéria pro klasifikování aktivních látek ze skupiny BCS I byly odlehčeny s respektem k požadavkům na rozpustnost a permeabilitu;
- Nově je umožněno aktivním látkám ze skupiny BCS III podstoupit biowaiver proceduru, když budou dodrženy přísnější disoluční kritéria;
- Dokument dále umožňuje léčivým přípravkům ze třídy BCS II, které jsou slabými kyselinami a mají poměrnou hodnotu dávka:rozpustnost 250 ml nebo méně při pH 6,8 se zapojit do biowaiver procedury. Musí se však rychle rozpouštět při pH 6,8 a musí vykazovat podobnost s referenčním produktem při pH 1,2 a 4,5.

Tab. 5. BCS třídy a možnost žádosti biowaiver podle HHS-FDA
(WHO, Annex 8, 2006)

CLASS I <i>Highly permeable</i> <i>Highly soluble</i> <i>Eligible</i>	CLASS II <i>Highly permeable</i> <i>Poorly soluble</i> <i>Not eligible</i>
CLASS III <i>Poorly permeable</i> <i>Highly soluble</i> <i>Not eligible</i>	CLASS IV <i>Poorly permeable</i> <i>Poorly soluble</i> <i>Not eligible</i>

Tab. 6. BCS třídy a možnost žádosti biowaiver podle WHO
(WHO, Annex 8, 2006)

	D:S 250 ml ↓	
	CLASS I <i>Highly permeable</i> <i>Highly soluble</i> <i>Eligible</i>	CLASS II <i>Highly permeable</i> <i>Poorly soluble</i> <i>Eligible only if the D:S is 250 ml or lower at pH 6.8</i>
85% abs →	CLASS III <i>Poorly permeable</i> <i>Highly soluble</i> <i>Eligible if very rapidly dissolving</i>	CLASS IV <i>Poorly permeable</i> <i>Poorly soluble</i> <i>Not eligible</i>

2.6.2. WHO dodatečná kritéria pro aplikaci biowaiver žádosti

Pro každou účinnou látku v EML seznamu léčiv je přísně doporučeno vyhodnotit nejenom fyzikálně-chemické vlastnosti léčiva, ale hlavně se zaměřit na výhody, které budou vyplývat z použití „biowaiver“ zaregistrovaného léčiva na národní úrovni. Jako příklad může posloužit amoxicilin, který je používán ambulantně k léčbě středně závažných onemocnění horního respiračního

traktu, infekcí močových cest. V jiných zemích může být amoxicilin použit k léčbě život ohrožujících infekcí, u kterých je riziko pro pacienta závažnější, když by léčivý přípravek nebyl bioekvivalentní.

2.6.2.1. Následné podmínky WHO:

- (1) BCS klasifikace (podle upravených kritérií) aktivní látky.
- (2) Vyhodnocení rizika: Biowaiver procedura může být povolena pouze, když je potenciální přínos veřejnému zdraví i individuálním pacientům převažuje nad rizikem nesprávně použitého biowaiver a jeho důsledky.
- (3) Disoluční požadavky pro léčivý přípravek:
 - velmi se rychle rozpouštějící (uvolnění > 85 % deklarovaného množství léčivého přípravku během 15 minut) ve standardním médiu při pH 1,2, 4,5 a 6,8 s rotační rychlostí 75 rpm v disolučním přístroji opatřeném míchadlem nebo při 100 rpm za použití disolučního přístroje s košíčkem (toto platí pro léčivé přípravky v BCS třídě III);
 - rychle se rozpouštějící (uvolnění >85% deklarovaného množství během 30 minut) ve standardním médiu 1,2, 4,5 a 6,8 s rotační rychlostí 75 rpm v disolučním přístroji opatřeném míchadlem nebo při 100 rpm za použití disolučního přístroje s košíčkem (toto platí pro léčivé přípravky v BCS třídě I a/nebo třídě II, pokud jsou slabými kyselinami a rozpustí se v 250 ml při pH 6,8).
- (4) Související úvahy o excipientech

Národní registrační autorita by si měla být vědoma toho, že některé excipienty mohou ovlivnit motilitu a/nebo permeabilitu v GIT. Proto by měly být excipienty použité v generických léčivých přípravcích podrobně prozkoumány.

V této souvislosti se může národní registrační autorita obrátit na podobné případy obdobných lékových formulací, které již byly dříve schváleny na základě bioekvivalenčních studií provedených na lidech v dané zemi nebo v jiných státech.

Pokud generický produkt vykazuje po přezkoumání stejné složení a podobné množství excipientů použitých již v jiné formulaci se stejnou aktivní látkou, tak může být racionálně usuzováno, že excipienty nebudou mít neočekávané důsledky na biologickou dostupnost léčivého přípravku. V případě, že se lékové formy liší v obsahu různých excipientů, nebo množství stejného excipientu je výrazně jiné od obvyklého množství, tak může národní registrační autorita zamítnout žádost o biowaiver.

Adresa on-line databáze obvyklých excipientů je k nalezení na této adrese: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm>. Lékové formy některých léčivých přípravků mohou být nalezeny na webových stránkách některých národních regulačních autorit.

Obecně nemá většina excipientů vliv na permeabilitu léčiv. S výjimkou lauryl-sulfátu žádný jiný excipient neovlivnil integritu Caco-2 monovrstvy. Lauryl-sulfát sodný mírně zvýšil permeabilitu skoro všech léčiv. Tween 80 významně zvyšuje permeabilitu furosemidu, cimetidinu a hydrochlorothiazidu ve směru apikálně-bazolaterálním, pravděpodobný mechanismus je inhibice jejich aktivního efluxu. Dokusát sodný mírně zvyšuje permeabilitu cimetidinu.

Devět běžně používaných excipientů v IR pevných lékových formulacích a roztocích, které reprezentují hlavní funkční kategorie excipientů (Rege et al., 2001):

Tab. 7. Přehled běžně používaných excipientů v IR léčivých přípravcích
(Rege et al., 2001)

Laktosa monohydrát	Lauryl-sulfát sodný
Hydroxypropyl methyl celuloza (HPMC)	Propylen glykol
Dokusát sodný (dioktyl sulfosukcinát-sodný),	EDTA sodný
Polyethylen glykol 400 (PEG 400),	Tween 80
Bezvodá třešňová příchuť	

Vliv možného ovlivnění permeability v modelovém Caco-2 systému byl testován na těchto léčivech s nízkou permeabilitou: atenolol, ranitidin HCl, acyklovir, furosemid, cimetidin a hydrochlorothiazid. Pro většinu těchto léčiv pravděpodobně dominuje mechanismus paracelulární cesty průchodu membránou.

Pokud tedy běžně používané excipienty v IR pevných a tekutých lékových formulacích neovlivňují významně průchod membránou nízko-permeabilních léčiv, tak je pravděpodobné, že nebudou ovlivňovat ani permeabilitu léčiv s vysokou mírou permeability (Rege et al., 2001).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY

3.1. PŮVODNOST DAT

Jak již vyplývá z teoretické části, soustředil jsem se v experimentální části pouze na ty aktivní látky, které vlastní Zentiva ve svém portfoliu a existují v IR lékových formulacích. Údaje jsou původní a byly získány ze závěrečných (finálních) zpráv z bioekvivalenčních studií. Jako srovnání s výsledky z firmy Zentiva uvádím údaje kanadské firmy Anapharm. Abych mohl provést konečné vyhodnocení, bylo zapotřebí klasifikovat dané léčiva do skupin podle BCS. Jednotlivé údaje o jejich zařazeních do BCS tříd byly získány z různých databází a monografií, dosažitelných přes portál PubMed a TSRL Inc. (PubMed, TSRL Inc.).

3.2. ZÁMĚR

Na podkladě shromažďování výsledků z bioekvivalenčních studií (celkem 113) jsem měl v záměru demonstrovat vliv rozpustnosti a permeability, jako dvou hlavních kritických faktorů, na neúspěšnost v BE-studiích. Provedl jsem retrospektivní analýzu portfolia firmy Zentiva z pohledu BCS od roku 1994 do závěru roku 2008. Na počátku jsem vyslovil hypotézu, že léčivé látky z BCS třídy I budou mít teoreticky nejmenší výskyt procentuální chybovosti v BE-studiích, protože záleží především na technologických vlastnostech lékové formy, tj. disolučním profilu. Pokud u molekul BCS třídy III vycházíme z teoretických poznatků a pokud by byly dodrženy přísnější disoluční kritéria, tak jsem rovněž očekával (Yu et al., 2002; Blume et Schug 1999), že míra chybovosti bude u této skupiny nižší. Totiž ve vědeckých kruzích zabývajících se problematikou BCS se hovoří o potenciálně možném aplikování biowaiver žádostí i pro molekuly, které patří do BCS třídy III. Co se týče molekul BCS třídy II, tak je obecně známo mezi generickými farmaceutickými firmami, že v případě pokusů o vytvoření potenciálně úspěšné generické lékové formy s účinnou látkou zařazené do BCS třídy II se míra chybovosti výrazně odlišuje od jiných BCS tříd a počet chyb se radikálně zvyšuje. FDA umožňuje aplikovat biowaiver proceduru pouze pro léčiva z BCS třídy I. Co se týče srovnání

chybovosti v BE-studiích mezi firmou Zentiva a Anapharm jsem očekával, že výsledek bude do určité míry podobný a zároveň procentuální odchylky směrem k nižší chybovosti mohou poukazovat na kvalitu generické produkce firmy Zentiva.

3.3. PŘEHLED AKTIVNÍCH LÁTEK V PORTFOLIU ZENTIVY V IR LÉKOVÝCH FORMÁCH

Tab. 8. Přehled aktivních látek v portfoliu Zentivy v IR lékových formách

BCS třída I	BCS třída II	BCS třída III	BCS třída IV
Alprazolam	Atorvastatin	Amlodipin	Hydrochlorothiazid
Ambroxol	Bicalutamid	Acebutolol	Meloxicam
Amitriptylin	Carvedidol	Alendronat	
Bisoprolol	Cyproteron acetát	Clopidogrel	
Cetirizin	Diklofenak	Fluconazole	
Citalopram	Ezetimib	Kodein	Neklasifikováno
Diltiazem	Glimepirid	Losartan	Fenylefrin
Doxazosin	Ibuprofen	Metformin	Itoprid
Ethinyl estradiol	Ibuprofen lysinát	Ondansetron	Sibutramin
Fexofenadin	Lamotrigin	Paracetamol	Tiaprid
Kofein	Pioglitazon	Pseudoefedrin	Tibolon
Levocetirizin	Repaglinid	Quetiapin	
Memantin	Risperidon	Risedronat	
Metoprolol	Simvastatin	Rosuvastatin	
Mirtazapin	Telmisartan	Sumatriptan	
Ofloxacin	Valsartan	Topiramát	
Rivastigmin			
Sildenafil			
Terbinafin			
Tolterodin			
Tramadol			
Venlafaxin			
Zolpidem			

Seznam těchto molekul jsem vytvořil výběrem ze seznamu všech aktivních látek z firemní databáze s podmínkou výskytu alespoň jedné IR lékové formy. Kritérium IR lékové formy splnilo celkem 62 aktivních látek. Jednotlivé látky jsem následně seřadil v tabulce č. 8 do jednotlivých BCS tříd na základě on-line dostupných informací. Ve většině případů byla přiřazena BCS třída z on-line databáze firmy TSRL Inc. z jejich webových stránek <http://www.tsrlinc.com/services/bcs/index.htm>, v ostatních nebo sporných případech byla BCS třída přiřazena z dostupných monografií, k jednotlivým látkám zabývající se BCS klasifikací. Vyskytlo se celkem 5 případů, kdy nešlo určit BCS zařazení, viz tabulka č. 8. Jelikož se někdy v BE-studiích stanovují kromě účinných látek i metabolity, tak první seznam jsem rozšířil o dalších 16 položek. Všech 16 metabolitů jsem zařadil do BCS tříd dle výchozích BCS tříd jejich mateřských molekul. Celkem bylo v BE-studiích stanovováno 78 molekul.

Tab. 9. Seznam metabolitů

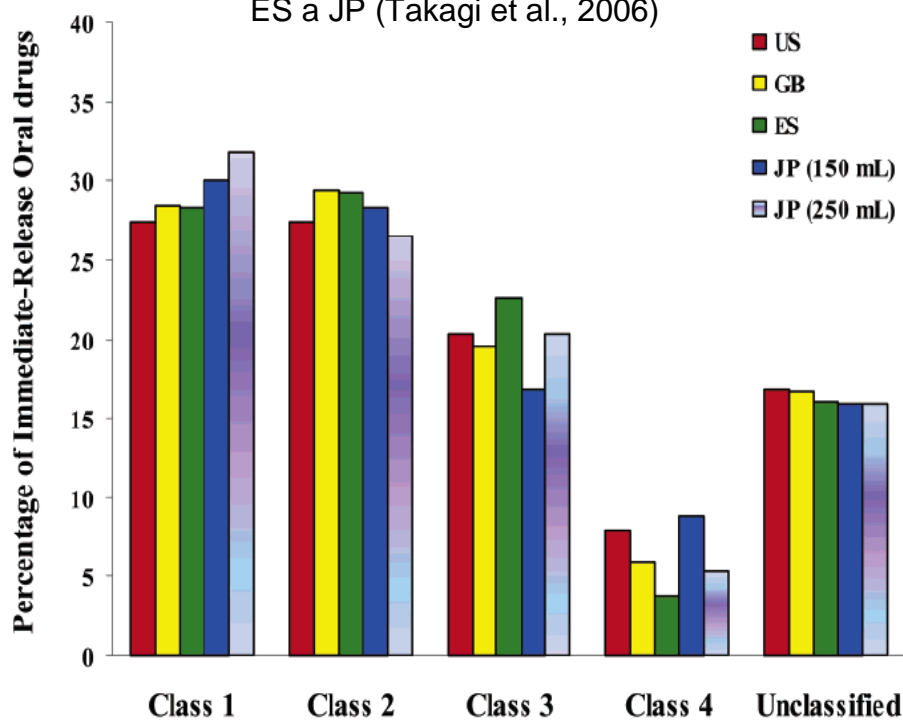
BCS třída I	BCS třída II	BCS třída III	BCS třída IV
Desmethylcitalopram	4-OH-atorvastatin	Clopidogrel karb. kys.	N-mono-desmethylsibutramin
N-desmethyl sildenafil	2-OH-atorvastatin	Losartan (metabolit)	N-di-desmethylsibutramin
5-OH-methyltolterodin	Ezetimib glucuronide		alfa-OH-tibolon
O-desmethylvenlafaxin	OH-pioglitazon		beta-OH-tibolon
	9OH-risperidon		
	OH-simvastatin		

3.4. SROVNÁNÍ PORTFOLIA ZENTIVY V MEZINÁRODNÍM MĚŘÍTKU Z POHLEDU BCS

Podle provizorního zařazení 200 nejčastěji podávaných IR léčivých přípravků ve Spojených státech (US), Velké Británii (GB), Španělsku (ES) a Japonsku (JP) do BCS tříd (Takagi et al., 2006) jsem vytvořil pro srovnání

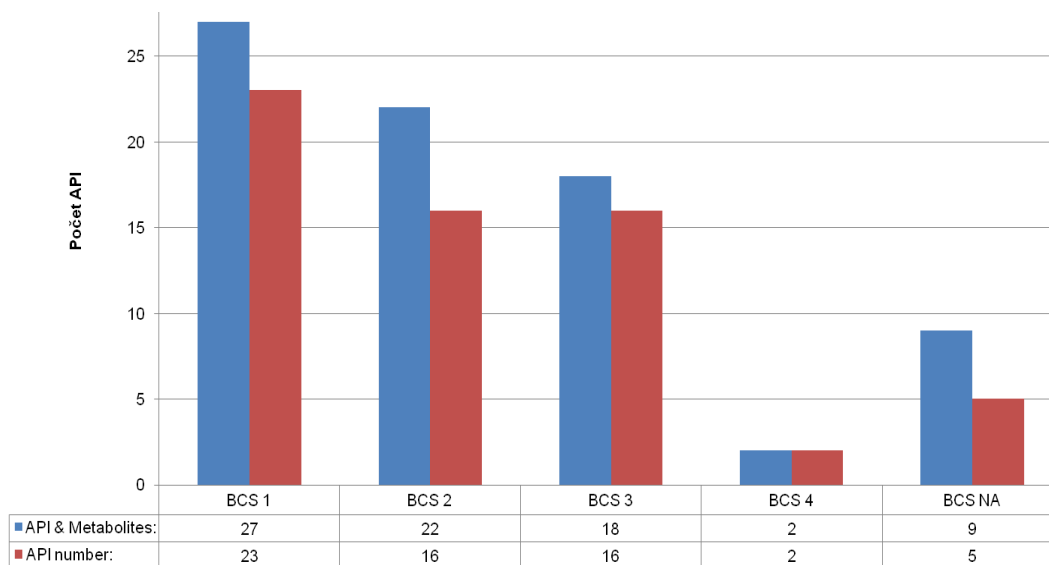
obdobný graf, viz níže. Pro přehlednost jsem jednotlivé BCS třídy rozdělil na dvě části, mateřské molekuly vč. metabolitů a pouze na mateřské molekuly. Na základě in vitro in vivo korelací je pochopitelné, že nejvíce léčivých látek existuje v BCS třídě I. Jak již bylo v teoretické části uvedeno, je efektivnější a finančně únosnější vyvíjet nebo vybírat takové molekuly, které budou mít vhodné „biofarmaceutické“ vlastnosti, tj. mít vysokou rozpustnost i permeabilitu. Jako druhá nejčetnější skupina je BCS třída II. Z farmaceuticko-technologického pohledu lze na BCS třídu II nahlížet tak, že s určitým úsilím lze dosáhnout dostatečně kvalitní lékovou formulaci,

Graf 1. BCS klasifikace IR lékových forem podávaných per os v USA, UK, ES a JP (Takagi et al., 2006)



kde se zpravidla použije taková technologie, aby i při velmi nízkých hodnotách rozpustnosti za současné vysoké permeability bylo dosaženo ideálních farmakokinetických parametrů, např. zmenšení velikosti částic.

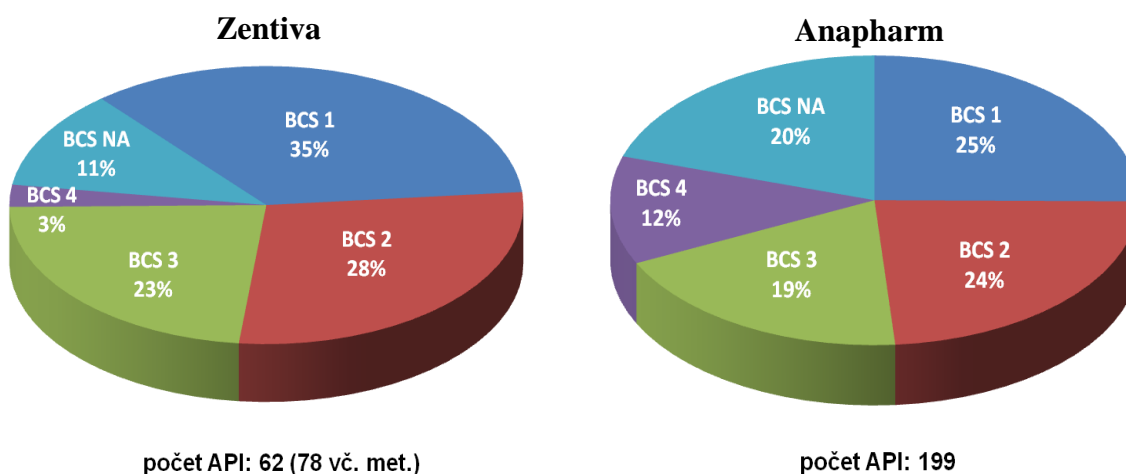
Graf 2. BCS klasifikace IR lékových forem v Zentivě účinných látek a metabolitů



3.5. POČET ÚČINNÝCH LÁTEK (VČ. METABOLITŮ) PODLE BCS

Jak již uvedl výše, byly mi pro srovnání poskytnuty údaje kanadské firmy Anapharm, která provedla retrospektivní analýzu dat z BE-studií podle znalostí BCS tříd u dílčích molekul s celkovým počtem 199 účinných látek a v celkové výši 1595 BE-studií. Zentiva se svým počtem aktivních látek tvoří přibližně třetinu objemu aktivních látek při srovnání s Anapharmem. Následující graf č. 3 názorně prezentují velikosti jednotlivých BCS tříd. Největší podíl patří BCS třídě I.

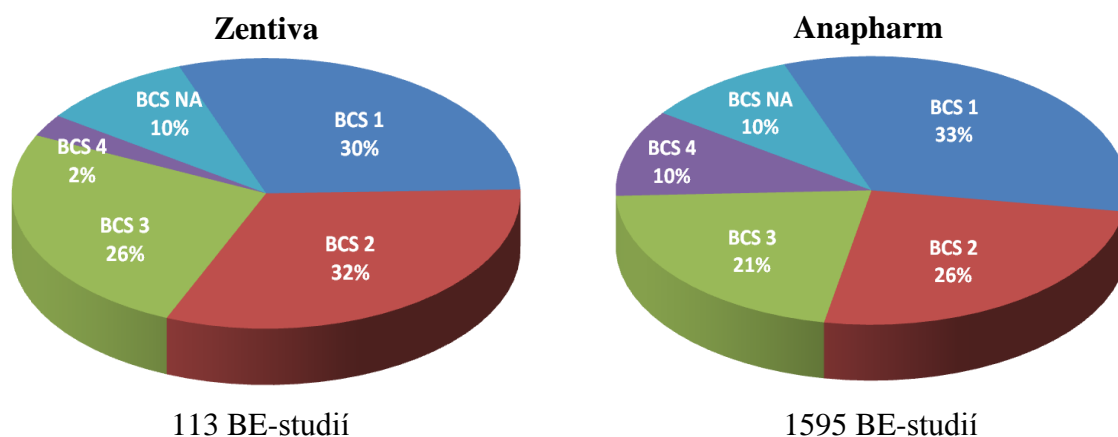
Graf 3. Počty aktivních látek vč. metabolitů



3.6. POČET BE-STUDIÍ PODLE BCS

Graf č. 4 ukazuje, kolik BE-studií bylo celkem provedeno, tj. Zentiva 113 a Anapharm 1595 BE-studií s procentuálním vyjádřením a seřazením podle BCS klasifikace.

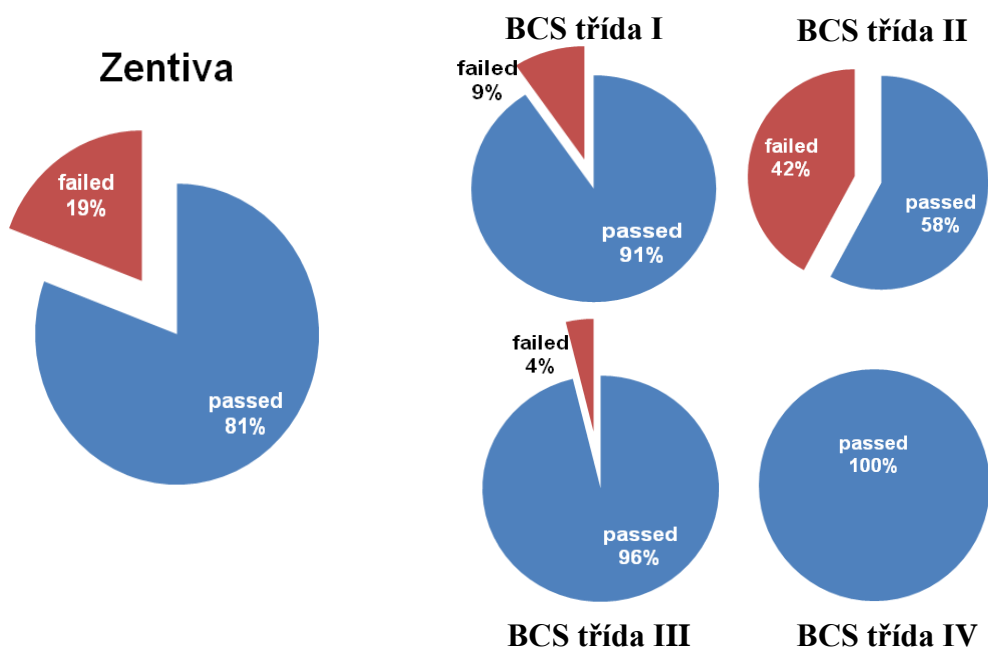
Graf 4. Počet BE-studií



3.7. ÚSPĚŠNOST BE-STUDIÍ

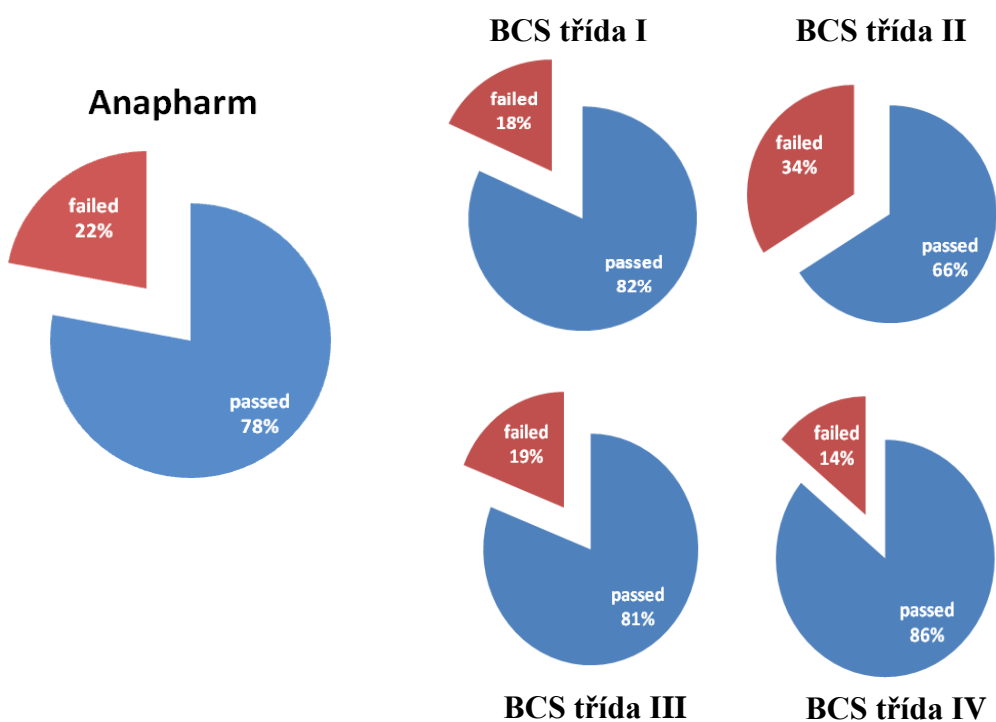
Abych mohl klasifikovat BE-studii za úspěšnou nebo neúspěšnou, musel jsem definovat určité podmínky, kdy tomu tak nastane. Hodnotil jsem, jestli se výsledné hodnoty těchto tří parametrů (srovnání testovaného a referenčního přípravku), AUC(0-t), AUC(0-∞) a C_{max}, nacházejí v nastavených intervalech. Intervaly pro AUC byly ve všech případech 80 – 125 %, v případě C_{max} byly nastaveny tyto tři hodnoty: 80 – 125 %, 75 – 133 %, 70 – 143 %. Výsledek pak byl buď „úspěch“ nebo „selhání.“ Výskyt chyb během BE-studií byl obecně nízký pro vysoko permeabilní molekuly z BCS tříd I a III. Předpoklad, který jsem vyslovil pro BCS třídu II, byl potvrzen a v této třídě byla chybovost větší. Dosáhla 42 %, což odpovídá téměř každé druhé provedené BE-studii. Zdá se, že diskriminujícím faktorem v BCS třídě II je nízká rozpustnost těchto molekul. Překvapivé bylo zjištění, že míra chybovosti v BCS třídě IV byla nejnižší. Procentuální neúspěšnost Zentivy v rámci BCS tříd byla vypočítána na 9 %, 42 %, 4 %, 0 % v BCS třídách I, II, III, IV. Celkové procento neúspěchu bylo v Zentivě 19 %.

Graf 5. Grafy znázorňující graficky neúspěch BE-studií Zentivy



Souhrn výsledků Anapharmu se moc neliší velkou mírou od výsledků Zentivy, ale přesto jsou mezi nimi rozdíly. Procentuální neúspěšnost Anapharmu v rámci BCS tříd byla prezentována následně 18 %, 34 %, 19 %, 14 % v BCS třídách I, II, III, IV. Celková neúspěšnost byla 22 %.

Graf 6. Grafy znázorňující graficky neúspěch BE-studií Anapharmu



4. DISKUZE

Po porovnání získaných údajů mezi Zentivou a Anapharmem, jsem vyslovil názor, že Zentiva ve výsledku produkuje kvalitní generické léčivé přípravky, jelikož chybovost BE-studií v BCS třídě I a III byla nižší než 10 % v porovnání s Anapharmem, jehož chybovost v BE-studiích v BCS třídě I a III byla 18, resp. 19 %. Anapharm není generickou firmou, ale provádí BE-studie pro mnohé farmaceutické firmy, které mu dodávají své generické (ale i originální) léčivé přípravky pro klinické hodnocení. Jelikož je neúspěšnost BE-studií okolo 20% a není ovlivněna chybami Anapharmu, ale kvalitou léčivých přípravků dodaných firmě Anapharm různými farmaceutickými firmami, domnívám se tedy, že kvalita generické produkce, zpracovávané firmou Anapharm byla ve srovnání se Zentivou nižší.

Vzhledem k horším biofarmaceutickým vlastnostem léčiv patřících do BCS třídy II bylo potvrzeno, že léčiva spadající do této BCS třídy vykazují určité komplikace a tudíž farmaceutické firmy z nich budou mít pravděpodobně obavy. Výsledky z BCS třídy IV nelze zevšeobecňovat, jelikož referenční vzorek byl příliš malý.

5. ZÁVĚR

Díky retrospektivní analýze výsledků z BE-studií a zakomponování BCS do úvah o výskytu určité míry neúspěšnosti lze vyvodit závěr, že určité riziko vzniku chyb existuje vždycky, avšak s tím rozdílem, že v BCS třídách I a III je procentuální neúspěšnost nejnižší. Co se týče generických léčiv, nelze s jistotou předpokládat zaručený úspěch v případě, kdy se farmaceutická firma rozhodne vytvořit generikum s hlavní účinnou látkou z BCS třídy I nebo III, ale lze očekávat nízký výskyt komplikací souvisejícími s vývojem daného generika a během BE-studií.

Existují rozdíly v chápání a aplikovatelnosti biowaiver žádostí pro americký a evropský trh, jak je možné dedukovat z teoretické části této práce.

Přísnější trh, který je kontrolován hlavní regulační autoritou FDA je ten americký, otázkou však může být, jestli FDA pouze nechrání své „americké“ originální farmaceutické společnosti před generickými firmami? Je tato „dražší“ strategie z dlouhodobého hlediska ekonomicky udržitelná, zatímco se celý svět, včetně Ameriky propadá do finanční recese?

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Aguiar AJ, Krc JJR, Kinkel AW, Samyn JC. Effect of polymorphism on the absorption of chloramphenicol from chloramphenicol palmitate. *J Pharm Sci* 1967; 56(7):847-853.

Amidon GL, Lennernäs 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* 1995; 12(3):413-420.

Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res* 1991; 175(3):880-885.

Avdeef A. Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state). *Curr Top Med Chem* 2001; 1(4):277-351.

Blume HH, Schug BS. The biopharmaceutics classification system (BCS): Class III drugs – better candidates for BA/BE waiver? *Eur J Pharm Sci* 1999; 9(2):117-121.

Chiou WL, Barve A. Linear correlation of the fraction of oral dose absorbed of 64 drugs between human and rats. *Pharm Res* 1998; 15(11):1792-1795.

Davis SS, Hardy JG, Fara JW. Transit of pharmaceutical dosage forms through the small intestine. *Gut* 1986, 27(8):886-892.

Dressman JB, Amidon GL, Fleisher D. Absorption potential: Estimating the fraction absorbed for orally administered compounds. *J Pharm Sci* 1985; 74(5):588-589.

EMA, European medicines agency : Committee for medicinal products for human use: *Guideline on the investigation of bioequivalence*. [cit. 24.07.2008], dostupné z URL: <www.emea.europa.eu/pdfs/human/qwp/140198enrev1.pdf>

EMA, European medicines agency : Committee for medicinal products for human use: *Concept paper on BCS-based biowaiver* [cit. 24.05.2007], dostupné z URL: <www.emea.europa.eu/pdfs/human/ewp/21303507en.pdf>

EMA, European medicines agency : Committee for proprietary medicinal products (CPMP), *Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence*. [cit. 14.12.2000], dostupné z URL: <www.emea.europa.eu/pdfs/human/qwp/140198enrev1.pdf>

FDA, U.S. department of health and human services food and drug administration, 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*. [online], [cit. srpen 2000], dostupné z URL: <<http://www.fda.gov/cder/guidance/3618fnl.pdf>>

FDA, U.S. department of health and human services food and drug administration, Center for drug evaluation and research (CDER): *Guidance for industry*, [cit. listopad 1995] Dostupné z URL: <www.fda.gov/cder/guidance/cmc5.pdf>

Hancock BC, Parks M. What is the solubility advantage of amorphous pharmaceuticals? *Pharm Res* 2000; 17(4):397-404.

Johnson KC, Swindell AC. Guidance in the setting of drug particle size specification to minimize variability in absorption. *Pharm Res* 1996; 13(12):1795-1798.

Kasim NA, Whitehouse M, Ramachandran C, Bermejo M, Lennernäs H, Hussain AS, Junginger HE, Stavchansky SA, Midha KK, Shah VP, Amidon GL. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Mol Pharm* 2004; 1(1):85-96.

Krämer SD. Absorption prediction from physicochemical parameters. *Pharm Sci Technolo Today* 1999; 2(9):373-380.

Li S, He H, Parthiban JL, Yin H, Serajuddin ATM. IV-IVC considerations in the development of immediate-release oral dosage form. *J Pharm Sci* 2005; 94(7):1396-1417.

Lindahl A, Ungell AL, Lennernäs H. Characterization of fluids from the stomach and proximal jejunum in men and women. *Pharm Res* 1997; 14(4):497-502.

Persson E. Drug dissolution under physiologically relevant conditions in vitro and in vivo (Dissertation). Uppsala, Sweden: Uppsala university Faculty of pharmacy, 2006. 65 p.

PubMed: [online databáze]. Dostupné z URL <www.pubmed.gov> PubMed je služba U.S. National Library of Medicine, která obnáší přes 18 miliónů citací z MEDLINE a dalších vědeckých žurnálů s biomedicínskými články od roku 1948. PubMed obsahuje odkazy k plným textům a k dalším s tímto spojeným zdrojům.

Pudipeddi M, Serajuddin ATM. Trends in solubility of polymorphs. *J Pharm Sci* 2005; 94(5):929-939.

Rege BD, Yu LX, Hussain AS, Polli JE. Effect of common excipients on caco-2 transport of low-permeability drugs. *J Pharm Sci* 2001; 90(11):1776-1786.

Serajuddin ATM, Jarowski CI. Effect of diffusion layer pH and solubility on the dissolution rate of pharmaceutical bases and their hydrochloride salts I: Phenazopyridine. *J Pharm Sci* 1985; 74(2):142-147.

Serajuddin ATM. Poorly aqueous soluble drugs and surface-active solid dispersion carriers. *Gattefosse Newsletter: Formulink* 2002; 7:1-4.

Takagi T, Ramachandran C, Bermejo M, Yamashita S, Yu LX, Amidon GL. A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan. *Mol Pharm* 2006; 3(6):631-543.

Therapeutic systems research laboratories Inc. (TSRL Inc.): [online databáze]. Dostupné z URL: <<http://www.tsrlinc.com/services/bcs/search.cfm>> Databáze shromažďující informace o BCS třídách léčivých látek.

WHO, World health organisation, WHO Technical report series, Geneva 2006, No. 937, Annex 7: *Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability*. Dostupné z URL: <http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_937_eng.pdf>

WHO, World health organisation, WHO Technical report series, Geneva 2006, No. 937, Annex 8: *Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for WHO Model List of Essential Medicines immediate-release solid oral dosage forms*. Dostupné z URL: <http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_937_eng.pdf>

WHO, World health organisation: *WHO model list of essential medicines (EML) 15th list*. [cit. březen 2007], dostupné z URL: <http://www.who.int/medicines/publications/08_ENGLISH_indexFINAL_EML15.pdf>

Yang Y, Faustino JP, Volpe DA, Ellison CD, Lyon CR, Yu LX. Biopharmaceutics classification of selected β -blockers: solubility and permeability class membership. *Mol Pharm* 2007; 4(4):608-614.

Yu LX, Amidon GL, Polli JE, Zhao H, et al. Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. *Pharm Res* 2002; 19(7):921-925.