

ARAŞTIRMA

Sağlıklı Gönüllülerde Biyoeşdeğerlik Çalışmaları: Olmesartan Medoksomil

Latif Özbay^{1,2}, Z. İrem Diler¹, Durişehvar Özer Ünal^{1,2}, Dilek Erol^{1,2}

ÖZET: Bu çalışmanın amacı 40 mg olmesartan medoksomil (CAS 144689-63-4) içeren test ve referans tablet formülasyonlarının, 36 sağlıklı gönüllüde biyoeşdeğerliğini araştırmaktır. Olmesartan medoksomil hipertansiyon tedavisinde kullanılan bir anjiyotensin II reseptör blokörüdür. Çalışma sırasında, gönüllülere 40 mg olmesartan medoksomil içeren iki ayrı formülasyon (test ve referans) 14 günlük arınma periyodu olan, açık etiketli, randomize, tek-doza, iki periyotlu, çapraz geçişli biyoeşdeğerlik çalışma tasarımı uygulanmıştır. Kan örnekleri uygulama sonrası 72. saate kadar alınmış, olmesartan medoksomilin plazma konsantrasyonları LC-MS/MS (liquid chromatography-tandem mass spectrometry) ile saptanmıştır. Eğri altındaki alan (EAA), ilacın en yüksek kan konsantrasyonu (C_{max}), maksimum kan konsantrasyonlarına erişilen zaman (T_{max}) bulunarak iki formülasyon karşılaştırılmıştır. %90 güvenlik aralığında, parametrik değerler C_{max} için 90.17-102.85, EAA_{0-last} için 90.73-102.34 ve $EAA_{0-\infty}$ için 91.13-102.47 arasında bulunmuştur. Bu değerler protokolda belirtilen kabul sınırların içindedir (80-125%). Sonuç olarak her iki formülasyonun farmakokinetik parametreleri arasında bir fark bulunamamış ve parametreler biyoeşdeğerlik kabul sınırları içinde bulunmuştur.

ANAHTAR KELİMELER: Biyoeşdeğerlik, olmesartan medoksomil, sağlıklı gönüllüler, LC-MS/MS

KURUM

¹Yeditepe Üniversitesi, İKU Kliniği/İLU Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye

²Yeditepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, İstanbul, Türkiye

İLETİŞİM

Latif Özbay

E-posta:

latifozbay06@hotmail.com

Gönderilme:

05.08.2011

Revizyon:

05.09.2011

Kabul:

06.09.2011

GİRİŞ

Biyoeşdeğerlik (BE), farmasötik eşdeğer olan iki müstahzarın, aynı dozda verilmesinin ardından biyoyararlanımlarının ve buna bağlı olarak, hem etkililik, hem güvenilirlik bakımından esas olarak aynı olmasını sağlayacak derecede benzer olmasıdır.^{1,2} BE'de, test ilaç (biyoeşdeğerliği araştırılan ilaç) ve referans ilaç (orijinal ilaç) için karşılaştırılan farmakokinetik parametreler; etken maddenin kandaki en yüksek derişimi (C_{max}), eğri altı alan (EAA), C_{max} 'a ulaşılabilmesi için geçen süre (T_{max}), terapötik eşdeğerliği de öngörmekte ve farmasötik kalite için in vivo kanıt özelliği taşımaktadır.³

BE çalışmalarında, ilacın plazmadaki konsantrasyon-zaman eğrisi, ilacın emilim ve eliminasyon oranını değerlendirmek için kullanılır. Bu çalışmalarda değerlendirme, genellikle etken madde derişiminin ölçülmesi üzerinden yapılmaktadır. Bunun nedeni C_{max} ve EAA değerlerinin, formülasyonlar arasındaki farkın değerlendirilmesinde metabolitlerden daha duyarlı olmasıdır. Ancak bazı durumlarda, etken madde ve metabolitleri veya yalnızca metabolitler ile eşdeğerlik değerlendirilmektedir. Eğer ortalamaların popülasyon

oranının %90 güven aralığı, EAA ve C_{max} için %80-125 sınırları arasında ise, ürünler biyoeşdeğer kabul edilir.^{1,2}

Olmesartan, kimyasal adı "(5-metil-2-okso-2H-1,3-dioxol-4-il)metil 4-(2-hidroksipropan-2-il)-2-propil-1-({4-[2-(2H-1,2,3,4-tetrazol-5-il)fenil]fenil}metil)-1H-imidazol-5-karboksilat" olup, kapalı formülü $C_{29}H_{30}N_6O_6$ ve molekül ağırlığı 558.585 g/mol'dür.^{3,4} Molekülün kimyasal yapısı Şekil 1'de verilmiştir. Olmesartan medoksomil, seçici bir anjiyotensin II reseptör (AT_1) antagonistidir. Hipertansiyon olgularında arteriyel kan basıncında doza bağlı azalmaya neden olur. Olmesartan medoksomil bir ön ilaçtır. Aktif metaboliti olan olmesartana dönüşmektedir.^{3,4} Oral alımından sonra hızla absorbe olur. Olmesartana hidrolize olarak etki gösterir. Oral biyoyararlanımı % 25.6'dır. Absorbsiyon yiyeceklerden etkilenmez. Plazmadaki en yüksek konsantrasyonlarına 1.0-2.0 saat (T_{max}) sonra ulaşır. Yüksek oranda plazma proteinlerine bağlanır (% 99). Eliminasyonu hızlıdır. Eliminasyon yarı ömrü ($T_{1/2}$) 13 saat kadardır. Olmesartan % 35-50 oranında renal yoldan, % 50-60 oranında safra yoluyla feçesten atılır.^{3,4}

Olmesartan ile yapılan biyoeşdeğerlik çalışmasında, gönüllülere sadece bir doz 40 mg olmesartan medoksomil içeren tablet verildiğinden, gönüllü için bu uygulama sonucunda herhangi bir tedavi edici etki (yarar) ya da risk öngörülmemektedir. Çalışma kapsamında olmesartanın plazma konsantrasyonu ölçülmüş ve biyoeşdeğerlik C_{max} , EAA_{0-last} (ilacın ilk uygulanmasından başlayıp son örnekleme zamanına kadar elde edilen plazma konsantrasyonu-zaman eğrisinin altında kalan alan), $EAA_{0-\infty}$ (sonsuz ekstrapole edilen plazma konsantrasyonu-zaman eğrisinin altında kalan alan) parametrelerine göre değerlendirilmiştir. Sonuçlar, test ve referans ilacın ortalama oranlarından hesaplanan % 90 güven aralığı (CI) ve birey-içi varyasyon katsayısı (CV) olarak sunulmuştur.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, sağlıklı katılımcılarda, tek-doz, açık etiketli, iki periyodlu, randomize, çapraz geçişli olarak Yeditepe Üniversitesi İyi Klinik Uygulamaları (İKU) Kliniği ve İyi laboratuvar Uygulamaları (İLU) laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışma Helsinki Deklarasyonu'na, ICH (International Conference on Harmonisation)-İKU Kılavuzu'na, EMA (European Medicines Agency) İKU Kılavuzu ve EMA Biyoeşdeğerlik Kılavuzu'na ve T.C. Sağlık Bakanlığı İKU Kılavuzu ve Biyoeşdeğerlik/Biyoyararlanım Yönetmeliği'ne uygun olarak yürütülmüştür. Çalışma protokolü ve çalışmada gerekli tüm dökümanlar T.C. Sağlık Bakanlığı Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Çalışmaya katılmak isteyen bütün gönüllüler önceden çalışma ile ilgili detaylı olarak bilgilendirilmişler ve katılmayı kabul eden gönüllüler, etik kurul tarafından onaylanan yazılı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu (BGOF) imzalamışlar ve çalışmaya dahil edilmişlerdir.

BE çalışmalarına katılacak gönüllülerin sağlıklı bireyler olmaları gerekmektedir. Kanser ilaçları ve HIV için geliştirilen anti-retroviral ilaçlar gibi sitotoksik ilaçlarla yapılan BE çalışmalarına, ilgili hastalıklara sahip gönüllüler kabul edilmektedir. Bu nedenle sağlıklı gönüllülerin belirlenmesi ve seçilmesi için çalışmaya dahil olma ve dahil olmama kriterleri belirlenmiştir. Çalışmaya katılacak olan gönüllüler belirtilen çalışmaya dahil olma kriterleri: yapılan klinik muayene ve tetkikler sonucu sağlıklı olmak, 18-55 yaş arasında erkek olmak, beden kütle indeksi 17.1 - 29 kg/m² olmak, araştırmacı ile iletişim kurabilme yeteneğine sahip olmak, bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu imzalamış olmak ve çalışmaya dahil olmama kriterleri: geçmişte ya da halen mevcut kardiyovasküler, pulmoner, hepatik, renal, hematolojik, gastrointestinal, endokrin, immüno-lojik, dermatolojik, nörolojik ve psikiyatrik hastalığının olması, klinik olarak anlamlı herhangi bir laboratuvar testinde ya da EKG bulgularında normal sınırların dışında sonuçlar saptanması, HIV, HbsAg ve HCV testlerinin sonuçlarının pozitif

olması, günde beş adetten fazla sigara içilmesi, ilaç bağımlılığı, çalışma öncesi yapılan idrar tarama testlerinde bağımlılık yapan ilaçlardan herhangi birinin pozitif olarak saptanması, alkolün kötü kullanımı, (örneğin: günde 2 ünite veya haftada 10 ünite alkolden daha fazla düzenli alkol kullanmak veya alkolizm öyküsü (1 ünite alkol = ½ litre bira, 200 ml şarap veya 50 ml alkollü içki) veya iyileşmiş alkolikler, metilksantin içeren içecek veya yiyeceklerin (kahve, çay, kola, kafein içeren sodalar, çikolata) günde 500 mg metilksantine eşdeğer ölçüde düzenli kullanımı, ilaç ya da yiyecek allerjisi, çalışmadan önceki üç haftalık sürede rutin vitaminler ya da lokal tedaviler dışında herhangi bir ilaç kullanımı, çalışmadan önceki bir aylık sürede ve çalışma sırasında herhangi bir nedenle özel diyet uygulaması, çalışmadan önceki üç ay içinde 500 ml'den fazla kan bağışında bulunulması, çalışmadan önceki üç ay içinde herhangi bir klinik ilaç araştırmasına katılmış olunması, çalışmadan önceki 48 saat içinde ve çalışma süresince aşırı fiziksel egzersiz yapılmış olması, geçmişinde yutma güçlüğü hikayesi olması, iletişim ve anlama sorunlarının olmasıdır. 36 sağlıklı gönüllü çalışmaya katılmadan önce bir şahit eşliğinde, çalışmanın içeriği hakkında bilgilendirme yapıldıktan sonra BGOF imzalanmış ve bu kriterlere göre değerlendirilerek çalışmaya dahil edilmişlerdir.

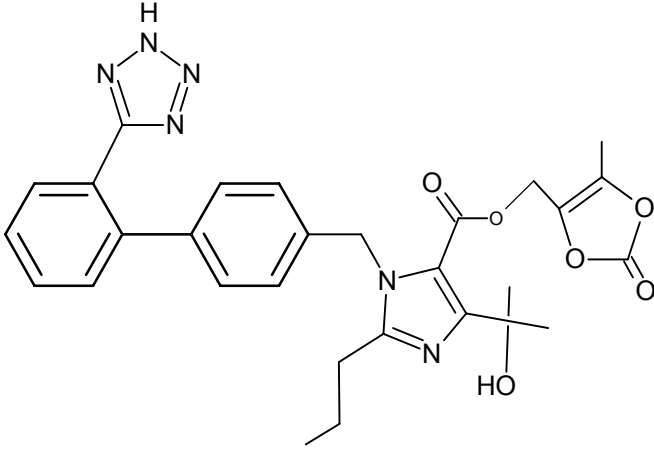
Çalışma tasarımı

Çalışma başlangıcında, istatistik analizlerden sorumlu uzman tarafından, randomizasyon tablosu ve randomizasyon kodları oluşturulmuştur. Katılımcılar ilaç uygulama gruplarına bu tablo yardımıyla randomize edilerek atanmışlardır. Bu şekilde çalışma başlangıcında dengelenmiş ilaç uygulama grupları oluşturulmuştur. BE çalışmaları iki aşamalıdır. Birinci aşamada, standardize edilmiş koşullarda sağlıklı gönüllülere test ve referans ilaç verilir. İkinci aşamada, ilaç için uygun arınma (washout) sürecinin ardından aynı gönüllülere çalışma protokolünde belirlenen ve birinci aşamada da uygulanan standart koşullarda, birinci aşamada test ilacı alan gönüllüye referans ilaç, referans ilacı alan gönüllüye test ilaç verilir. İlacın kinetiğini etkileyecek her türlü etken minimuma indirgenecek şekilde çalışmalar tasarlanmaktadır. Bu etkenler; ilacın metabolizasyonunu etkileyen yiyecekler, fiziksel aktivite, sigara, alkol, heyecan vb' dir.

Bu çalışmada iki periyod arasında ilacın kandan tamamen temizlenmesi için 14 günlük bir ilaçtan arınma zamanı bırakılmıştır. Her bir periyot da toplam 72 saat süresince 18 örnek alınmış ve plazmadaki olmesartan miktarı ölçülmüştür. İlaç uygulama dozu olarak belirlenen 40 mg olmesartan medoksomil içeren tablet, 72 saat içinde ölçülebilir plazma konsantrasyonunu sağlamaktadır. 40 mg olmesartan medoksomil içeren test ve referans tabletler, randomizasyon tablosundaki sıraya

TABLO 1. Varyans Analizi Özet Tablosu

	Difference	Difference SE	Ratio %	%90 CI		Power
C_{max}	-0.0377	0.0389	96.3	90.17	102.85	0.9999
AUC_{last}	-0.0371	0.0356	96.36	90.73	102.34	1
$AUC_{0-\infty}$	-0.0342	0.0347	96.64	91.13	102.47	1
T_{max}	-0.0439	0.1561	97.65	83.54	111.77	0.7573
$T_{1/2}$	-0.906	1.0051	92.14	77.38	106.89	0.7243
$MRT_{0-\infty}$	-0.7251	0.6127	93.46	84.12	102.81	0.9689



ŞEKİL 1. Olmesartan'ın molekül yapısı.

uygun olarak, uygulama günü sabahı aç karnına ve oral yol ile uygulanmıştır. Çalışma planında belirtildiği şekilde ilaç uygulamasından hemen önce (0), ilaç uygulamasından sonra 0.33, 0.66, 1.0, 1.25, 1.50, 1.75, 2, 2.33, 2.66, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72. saatlerde kan örnekleri (8 ml) alınmıştır. Alınan kan örnekleri 20 dakika içinde 3000 rpmde 10 dakika santrüj edilerek plazma ayrılmıştır. Plazma örnekleri laboratuvara nakil edilene kadar -80°C'lik derin dondurucu içinde saklanmıştır. Gönüllüler advers etkiler bakımından çalışma süresince araştırmacılar tarafından gözlemlenmiştir.

Biyoeşdeğerlik çalışmalarında istenilen istatistiksel gücü mümkün olan en küçük katılımcı grubuyla sağlaması gerekliliği göz önüne alınarak çapraz geçişli tasarım tercih edilmiş ve tasarımın gereği olarak çalışmada istenilen istatistiksel gücü sağlamak için her katılımcı kendi kontrolü olarak kullanılmıştır.

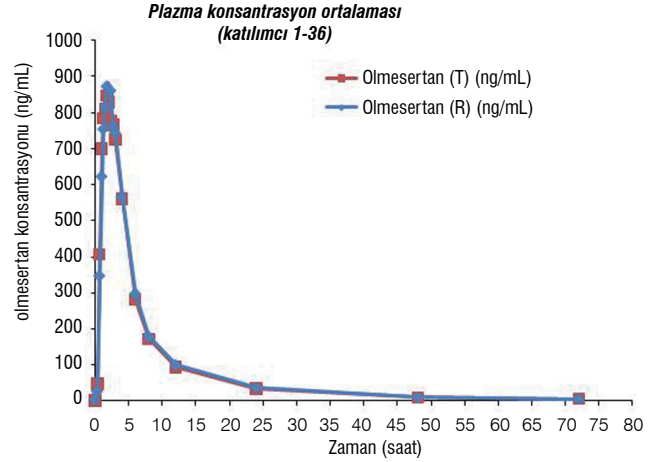
Numune Analizi

-80°C'de saklanan etiketli polipropilen tüpler, T.C. Yeditepe Üniversitesi İLU Laboratuvarı'na nakil edilmiştir. Olmesartanın plazmadaki konsantrasyonlarının ölçümü, yüksek performanslı sıvı kromatografisi- kütle spektrofotometresi (HPLC-MS) sistemi ve Gemini C18 (4.6x150mm, 5µm) (Phenomenex-USA) analitik kolon kullanılarak uygulanmıştır.

Cihaz analizinden önce, 1 ml plazmadan katı faz ekstraksiyonu ile olmesartan alınmıştır. Plazma numuneleri, analizi gerçekleştirilene kadar -80°C'lik derin dondurucu da bekletilmiştir. İç standart olarak valsartan kullanılmıştır. Numuneler Waters OASIS HLB 30 mg/96 well plate ile katı faz ekstraksiyonu ardından mobil faz ile rekonstitüe edilerek LC-MS/MS sistemine 5 µL enjekte edilmiştir.

Kromatografik Şartlar

LC-MS sistemi, bir adet dördümlü pompa, bir adet oto örnekleyici, bir adet termostatlı kolon fırını, 1 adet MS/MS dedektöründen oluşmaktadır.^{5,6} Analitik ayırım Gemini C18 (4.6x150mm, 5µm) kolonu kullanılarak yapılmıştır. Mobil faz izokratik olarak metanol: %0.05 Formik Asit: Asetonitril; 15:35:50 karışımından oluşmaktadır. Mobil faz akış hızı 0.5 mL/dakika ola-



ŞEKİL 2. Olmesartan test ve referans ilaca ait plazma ilaç konsantrasyonu-zaman grafiği

rak belirlenmiştir. Dedektör, Olmesartan için m/z: 445.15>149.30 ve Valsartan için m/z: 434.20>179.30'a ayarlanmıştır. Analiz çalışma süresi 15 dakika'dır. Olmesartan numunelerinin 2-2000 ng/mL konsantrasyon aralığında integrasyon değerleri sabit olarak kullanılmıştır.

İstatistiksel yöntem

Farmakokinetik Analizler

Plazma konsantrasyonlarının ölçülmesinden sonra farmakokinetik parametrelerin hesaplanması standart non-kompartmental metot kullanılarak yapılmıştır. Çalışma kapsamında katılımcılardan alınmış olan kan numunelerinin analizi ile elde edilen zamana karşı ilaç konsantrasyonu değerleri farmakokinetik parametrelerin hesaplanmasında kullanılmıştır. Farmakokinetik parametrelerin hesaplanması, Pharsight tarafından üretilen WinNonlin nonlineer modelleme yazılımının 5.0.1 versiyonu yardımıyla yapılmıştır. Test ve referans ürün arasındaki biyoeşdeğerliğin sınılanması amacıyla uygulanmış olan varyans analizinin (ANOVA) uygulaması için aynı yazılım kullanılmıştır.

GEREÇLER

40 mg Olmesartan içeren iki film kaplı tablet formülasyonunun sağlıklı katılımcılarda, açık etiketli, randomize, tek-doza, iki periyotlu çapraz geçişli biyoeşdeğerlik çalışması olan bu çalışmada test (Neutec Ar-Ge Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi, Türkiye, seri no: 3030) ve referans (Olmetec®, Daiichi-Sankyo, Almanya, seri no: 118741) tabletler kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan başlıca reaktifler ve kaynakları (reaktif; kaynak) metanol, asetonitril, formik asit; Sigma Aldrich ve deiyonize su; Sartorius Arium olarak kullanılmıştır.

Ekipman

Çalışmada kullanılan HPLC sistemi; Agilent 1100 seri dördümlü pompa (G1311A), Agilent 1100 seri oto örnekleyici (G1329A) ve MS sistemi; Waters Quattro Micro API Micromass QAB1496 MS/MS sistemlerinden oluşmaktadır. Sistem MassLynx V 4.1 yazılımı ile çalışmaktadır. Analitik kolon olarak Gemini C18 (4.6x150mm, 5µm) (Phenomenex, USA) kullanılmıştır.

Bioequivalence Studies in Healthy Volunteers: Olmesartan Medoxomil

ABSTRACT: This study aimed to investigate the bioequivalence of test and reference formulations of 40mg olmesartan medoxomil (CAS 144689-63-4) in 36 healthy male volunteers. Olmesartan medoxomil is an angiotensin II receptor antagonist used to treat high blood pressure. Volunteers were treated with two formulations of 40mg olmesartan medoxomil according to a fasting, randomised, open-label, crossover, single dose, two-period bioequivalence study design with a 14 days wash-out period. Blood samples were taken up to 72 h post-dose, the plasma concentrations of olmesartan medoxomil were determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). $AUC_{0-\infty}$, AUC_{0-last} , C_{max} and T_{max} were calculated for both formulations. The parametric 90 % confidence intervals for the primary target parameters were between 90.73-102.34 for AUC_{0-last} , 91.13-102.47 for $AUC_{0-\infty}$ and between 90.17-102.85 for C_{max} . The acceptance ranges prospectively defined in the protocol for this trial were fulfilled. Based on the available information it was determined between the bioequivalence acceptance range (80-125%). This single dose study found that the test and the reference products met the regulatory criteria for bioequivalence in these fasting healthy male volunteers.

KEYWORDS: Bioequivalence, olmesartan medoxomil, healthy volunteers, LC-MS/MS

SONUÇ VE TARTIŞMA

Çalışmaya katılan tüm katılımcılar beyaz ırka mensup, sağlıklı erkek bireyler olup, yaşlarının ortalaması 32.2 ± 6.2 , ağırlıklarının ortalaması 75.4 ± 13.9 kg ve boylarının ortalaması 168.6 ± 29.4 cm dir. Çalışma, belirlenen şartlara ve etik ilkelere uygun olarak tamamlanmıştır. Test ve referans formülasyonlar protokole uygun olarak oral yoldan uygulanmış, çalışma süresince herhangi advers etki veya advers olaya rastlanmamıştır.

Olmesartan plazma konsantrasyonu zamana karşı grafiğe geçirildiğinde test ve referans ilaçta benzer kinetik eğri elde edilmiştir (Şekil 2). Çalışma kapsamında olmesartan üzerinden yapılan istatistik analizler sonucunda çalışmanın birincil hedefi olan test ilacının birincil değişkenler açısından % 80-125 koşulunu (C_{max} için 90.17-102.85, EAA_{0-last} için 90.73-102.34 ve $EAA_{0-\infty}$ için 91.13-102.47) 0,99 istatistik güçte sağladığı belirlenmiştir (Tablo 1). Çalışmanın ikincil hedefi olan ilaç güvenliğinin değerlendirilmesi sonucunda ise, test ilaç ile referans ilaç için yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda bir fark gözlenmemiştir.

BE'in genel amacı; jenerik formülasyonun referans ilaçla benzer etki ve güvenlik özelliklerini taşıdığını göstermektir. BE çalışmaları, orijinal ilaç yerine jenerik ilacın güvenli bir biçimde kullanılabileceğinin göstergesidir. Bu çalışmada da olmesartan medoxomil içeren iki formülasyonun biyoeşdeğerlik çalışmaları için belirlenen kabul sınırları içinde olduğu gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Guideline On Investigation of Bioequivalence. 2008 EMEA; p 9-10 http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003011.pdf.
2. Farmasötik Müstahzarların Biyoyararlanım ve Biyoeşdeğerliliğinin Değerlendirilmesi Hakkında Yönetmelik. Resmi Gazete 27 Mayıs 1994, No: 21942.
3. Kerins, DM, Robertson RM, Robertson D. Drugs Used For The Treatment Of Myocardial Ischemia. In, Goodman&Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Tenth Ed. Editors: Hardman JG, Limbird LE, McGraw Hill, Int.Ed.,2001, pp.864.
4. Brunner HR, Olmesartan medoxomil: current status of its use in monotherapy. Vasc Health Risk Manag 2006;2(4): 327-40.
5. Vaidya VV, Roy SMN, Yetal SM, Joshi SS, Parekh SA. LC-MS-MS determination of Olmesartane in human plasma. Chromatographia 2008;67: 147-150.
6. Liu DY, Hu P, Matsushima N, Li XM, Li L, Jiang J. Quantitative Determination Of Olmesartane in Human Plasma and urine by Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. J of Liquid Chromatog B 2007;856: 190-197.