

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA ŠERČIĆ

RAČUNALNIŠKA SIMULACIJA BIOEKVIVALENČNIH RAZISKAV S
FIZIOLOŠKIMI FARMAKOKINETIČNIMI MODELI

V LJUBLJANI, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA ŠERČIĆ

RAČUNALNIŠKA SIMULACIJA BIOEKVIVALENČNIH RAZISKAV S
FIZIOLOŠKIMI FARMAKOKINETIČNIMI MODELI

COMPUTER SIMULATIONS OF BIOEQUIVALENCE STUDIES WITH
PHYSIOLOGICALLY BASED PHARMACOKINETIC MODELS

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala v Lek d.d., farmacevtski družbi pod mentorstvom prof. dr. Iztoka Grabnarja, mag. farm. in somentorstvom dr. Boštjana Markuna.

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Iztoku Grabnarju, mag. farm. in somentorju dr. Boštjana Markunu za vse strokovne nasvete pri izdelavi naloge.

Posebna zahvala gre moji družini in prijateljem za podporo in spodbudne besede v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko/magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Iztoka Grabnarja, mag. farm. in somentorstvom dr. Boštjana Markuna.

Maja Šerčič

Predsednik magistrske komisije: izr. prof. dr. Mitja Kos, mag. farm.

Mentor: prof. dr. Iztok Grabnar

Somentor: dr. Boštjan Markun

Član: Izr. prof. dr. Janez Ilaš, mag. farm.

VSEBINA

1	UVOD.....	1
1.1	Fiziološki farmakokinetični modeli	1
1.2	CAT model	3
1.3	ACAT model.....	5
1.4	Program GastroPlus™	6
1.5	Bioekvivalenčne raziskave	7
1.6	Simulacije bioekvivalenčnih raziskav	9
1.7	Acetilsalicilna kislina.....	13
2	NAMEN	14
3	METODE	15
3.1	PROGRAMSKA ORODJA.....	15
3.2	RAZVOJ FIZIOLOŠKEGA FARMAKOKINETIČNEGA MODELA	15
3.2.2	Podatki o učinkovini in farmacevtski obliki.....	15
3.2.3	Podatki o fiziologiji prebavnega trakta.....	16
3.2.4	Farmakokinetični parametri.....	17
3.3	RAZVOJ METODE SIMULACIJ BIOEKVIVALENČNIH RAZISKAV.....	18
3.3.1	Intraindividualna variabilnost.....	20
3.3.2	Vzorčenje.....	21
3.3.3	Izračun bioekvivalenčne statistike.....	21
4	REZULTATI in RAZPRAVA.....	24
4.1	FIZIOLOŠKI FARMAKOKINETIČNI MODEL	24
4.1.1.	Fizikalno kemijske lastnosti acetilsalicilne kisline.....	24
4.1.2	Parametri prostorskega modela	25
4.1.3	Farmakokinetični parametri modela.....	27

4.2	VREDNOTENJE MODELA	27
4.2.1	Simulacija bioekvivalenčne študije	29
4.3	HIPOTETIČNE FORMULACIJE	29
4.3.3	Plazemski profili formulacij	31
4.4	SIMULACIJA VIRTUALNIH BIOEKVIVALENČNIH RAZISKAV	37
4.5	OVREDNOTENJE RAZLIČNIH VPLIVOV NA SIMULACIJE	45
4.5.1	Vpliv hitrosti praznjenja želodca	45
4.5.2	Vpliv števila ljudi	47
4.5.3	Vpliv dodane intraindividualne variabilnosti	49
4.6	OVREDNOTENJE RAZVITE METODE	52
5	SKLEP	54
	Bibliografija.....	55
	Priloga I: R+ KODA.....	57
	Priloga II: POPULACIJSKI PARAMETRI	59

POVZETEK

Fiziološki farmakokinetični modeli služijo kot orodje za boljše razumevanje in napovedovanje obnašanja zdravila v telesu. V nalogi smo razvili metodologijo simulacije bioekvivalenčnih raziskav s komercialno dostopnim programom GastroPlus™.

Preučili smo literaturo in na podlagi že opisanih metod in izzivov simulacij bioekvivalenčnih študij s fiziološkimi farmakokinetičnimi modeli razvili lastno metodo simulacij. Prednost razvite metode je, da smiselno vključuje tako inter- kot intrasubjektivno variabilnost, obenem pa z dovolj velikim številom simulacij omogoča statistično relevantno oceno verjetnosti za uspešnost bioekvivalenčnih študij. Izziv predstavlja določitev ključnih parametrov, ki okarakterizirajo populacijo in pravilna variabilnost letih.

Metodologijo smo preizkusili na modelni učinkovini, acetilsalicilni kislini. Za potrebe raziskave smo izdelali sedem različnih hipotetičnih formulacij in s spreminjanjem velikosti delcev učinkovine dosegli različne profile sproščanja. Pri simulacijah smo uporabili tri različne čase prehoda skozi želodec, $t = 0,10, 0,25$ in $0,5$ ure in s tem ocenjevali vpliv različne hitrosti praznjenja želodca na plazemske profile. Ovrednotili smo tudi vpliv števila ljudi v vzorcu in dodane intraindividualne variabilnosti. Program omogoča izvedbo navzkrižnih študij, saj lahko uporabimo isto populacijo za virtualno simulacijo plazemskih profilov različnih formulacij. Tako smo vedno znova uporabili isto populacijo in opravili virtualno simulacijo na 1000 osebkih za vsako izmed naših sedmih formulacij, v časovnem intervalu štirih ur, z 62 točkami vzorčenja.

Razvita metodologija bo splošno uporabna v razvoju zdravil za načrtovanje bioekvivalenčnih študij na drugih učinkovinah in formulacijah.

Računalniške simulacije z uporabo fizioloških farmakokinetičnih modelov so uporabno orodje v razvoju zdravil, s katerimi lahko napovedujemo uspešnost kliničnih bioekvivalenčnih študij in obetajo cenejši in hitrejši razvoj zdravil, ter s tem večjo dostopnost novih farmacevtskih izdelkov.

ABSTRACT

Physiologically based pharmacokinetic models are tools for better understanding and prediction of effects of drugs on the body. In this thesis we have developed a methodology of bioequivalence study simulations with commercially available program GastroPlusTM.

Firstly we have studied the literature and previously described methodology for bioequivalence studies and on the basis of already described challenges developed our own method of bioequivalence studies simulations. The advantage of the developed method is that includes inter- as well as intrasubject variability. It allows us to assess the probability of passing bioequivalence study when repeating a big enough number of simulations. The key challenge remains characterising key population parameters and right variability of those.

Methodology was tested on model drug, acetylsalicylic acid. For the purpose of this research we have prepared seven hypothetical formulations with different dissolution profiles based on changing particle size. We have used three different stomach transit times $t = 0.10, 0.25$ in 0.5 h and evaluate the effect of different transit times on plasma concentrations. Furthermore, we have also evaluated the effect of number of people in the sample and added intrasubject variability. The program allows us to perform crossover studies, as we can use the same population to conduct virtual study on different formulations. Therefore, we used same population and ran virtual simulation on 1000 subjects for all seven formulations in interval of four hours and 62 sample points.

The developed methodology can be widely used for other substances and formulations, and is a new useful tool in designing bioequivalence studies.

Computer simulations using physiologically based pharmacokinetic models are tools in drug development that help us predict the success of bioequivalence studies, allow cheaper and faster drug development and consequently, better access to new pharmaceutical products.

SEZNAM OKRAJŠAV

Ae – delež odmerka izločenega v urinu

ANOVA – analiza variance

ASA – acetilsalicilna kislina

AUC – površina pod krivuljo

BE – bioekvivalenca

BCS – biofarmacevtski klasifikacijski sistem

C_{max} – maksimalna dosežena koncentracija

EMA – Evropska agencija za zdravila

FDA – Ameriška agencija za zdravila

KV – koeficient variacije

LADME – absorpcija, distribucija, metabolizem in ekskrecija

P_{eff} – efektivna permeabilnost

PBPK – fiziološki farmakokinetični model

1 UVOD

Računalniško modeliranje in simulacije se v digitalnem okolju in ob razvoju računalniške tehnologije vedno bolj uveljavljajo kot hitro in finančno ugodno orodje v razvoju zdravil.

Pri razvoju zdravil predstavljajo klinične študije najdalgotrajnejši in najdražji del razvoja. Fiziološki farmakokinetični modeli služijo kot orodje za boljše razumevanje in napovedovanje obnašanja zdravila v telesu, kar omogoča optimizirano načrtovanje in v nekaterih primerih tudi zmanjšanje števila potrebnih kliničnih študij. Z napredki v modeliranju in simulaciji in vivo procesov si lahko obetamo novosti na področju razvoja in regulative zdravil.

Pri razvoju generičnih zdravil moramo dokazati enakost generičnega izdelka z originatorjevimi in v ta namen izvajamo bioekvivalenčne študije, s pomočjo katerih ugotavljamo ali sta si zdravili v farmakokinetičnem pomenu enaki. Fiziološke farmakokinetične modele lahko tako uporabljamo tudi za simulacijo bioekvivalenčnih študij in na ta način skušamo vnaprej napovedati verjetnost uspešnosti le-teh.

1.1 Fiziološki farmakokinetični modeli

Model je vsaka predstavitev sistema, ki ni sistem, in jo uporabljamo namesto sistema, da bi pojasnili ali pridobili neke informacije o sistemu. Simulacija je del procesa načrtovanja modela in eksperimentiranja z modelom z namenom razumevanja ali napovedovanja obnašanja sistema (1).

Modeliranje lahko razdelimo na različne faze, med katere sodi: analiza in zbiranje podatkov o delovanju sistema (lahko vključuje tudi različne poskuse in meritve), definiranje namena uporabe modela, izgradnja modela, eksperimentiranje z modelom in vrednotenje ter verifikacija modela. Strmimo k čimbolj enostavnemu modelu, ki pa bo zajemal vse bistvene vplive dogajanja v procesu glede na namen uporabe modela. Poznamo fizične in abstraktne modele, slednji pa se delijo na miselne, verbalne in simbolične, ki so lahko logični ali matematični (1).

Čeprav se je raziskovanje na področju simulacije farmakokinetike zdravilnih učinkovin z uporabo fizioloških prostorskih modelov začelo že leta 1937, pa se farmacevtska industrija razširjeno poslužuje uporabe šele v zadnjih letih. Razlog za to leži v razvoju in dostopnosti

in silico in *in vitro* sistemov, ki opisujejo LADME procese in napredku v *in vivo in vitro* korelaciji teh podatkov (2).

Uporaba fizioloških farmakokinetičnih (ang. physiologically based pharmacokinetic, PBPK) modelov se raziskuje glede na namen uporabe. Uporabljajo se v razvoju kliničnih formulacij zdravila, ocenjevanju lastnosti učinkovin v začetnih fazah razvoja in s tem zmanjšanim tveganjem za neuspešen razvoj v kasnejših fazah (3).

PBPK modeliranje lahko uporabljamo za simulacijo kliničnih študij z zdravimi prostovoljci, lahko pa simuliramo tudi posebne populacije bolnikov, medsebojno delovanje zdravil ali pa vpliv hrane na zdravilo. PBPK modeliranje preučujejo tudi regulatorne agencije, saj se le-to vključuje tudi v smernice za predložitev registracijske dokumentacije. Omenja se tudi možna uporaba za vgrajeno kakovost (ang. quality by design, QbD) (2).

Ameriška Agencija za hrano in zdravila (FDA) je prvič uporabila PBPK modeliranje za oceno tveganja pri uporabi tretinoina v kremi proti gubam, saj je le-ta visoko teratogen. Danes FDA uporablja PBPK modeliranje in simulacije za odločitve o potrebi izvajanja specifičnih kliničnih študij, priporoča se tudi za načrtovanje študij. Ob razvoju kompleksnejših produktov v prihodnosti naj bi se vloga modeliranja in simulacij v regulatorni znanosti še povečala (4).

Nekatera farmacevtska podjetja uporabljajo orodja za modeliranje rutinsko za izbor kandidatne spojine za nadaljnji razvoj, za načrtovanje razvoja formulacij in za zmanjšanje števila poskusnih formulacij z namenom zmanjšanja stroškov (4).

Na voljo je vse več komercialno dostopnih programov, kot so GastroPlusTM, SimCYP Ltd., PKSIMTM in vse več je na voljo tudi poročil o različnih načinih uporabe v literaturi (5).

PBPK modeli so matematični modeli, ki vključujejo anatomske in fiziološke parametre živali ali ljudi, fizikalno kemijske lastnosti učinkovine in lastnosti formulacije farmacevtskega produkta z namenom predvidevanja absorpcije, distribucije, metabolizma in ekskrecije učinkovine *in vivo*. Na podlagi poznanih podatkov nam podajo kvantitativne napovedi (3).

Farmakokinetični model je definiran s strukturo in parametri. Zapisujemo ga matematično v obliki linearnih diferencialnih enačb prvega reda s konstantnimi parametri. Pri

prostorskih modelih je gastrointestinalni trakt opisan z enim ali več prostori, ti so definirani s fiziološkimi parametri kot so volumen, pH, hitrost pretoka krvi in sestava tkiva (6).

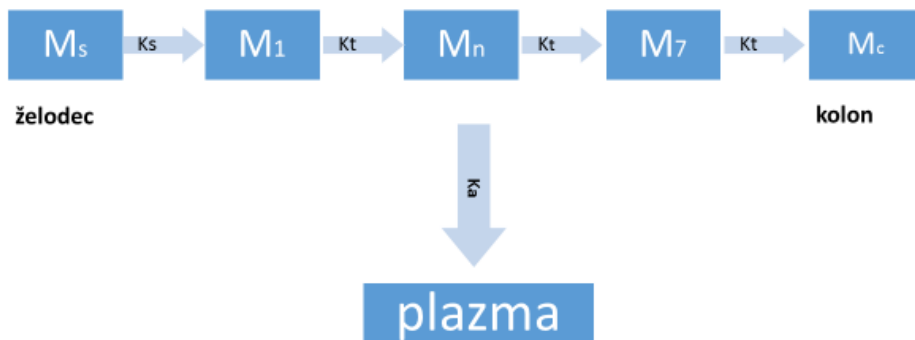
Model potrebuje za človeka ali živalsko vrsto specifične fiziološke parametre in podatke o lastnosti učinkovine, da lahko z njim predvidimo plazemske profile. Ob tem pa je potreben tudi mehanistični absorpcijski model, ki v večini sodobnih komercialno dostopnih programih sloni na CAT modelu (5).

1.2 CAT model

Prostorski absorpcijski in tranzitni model (ang. compartmental absorption and transit, CAT) spada med dinamične modele, ki opisujejo pot zdravila skozi človeški prebavni trakt.

CAT model opisuje prehod učinkovine skozi prebavni trakt - želodec, duodenum, jejunum, ileum - in pasivno absorpcijo v duodenumu, jejunumu in ileumu. Gastrointestinalni trakt v človeškem telesu v splošnem delimo na tri glavne segmente; želodec, tanko črevo in kolon. V CAT modelu je tanko črevo razdeljeno na 7 prostorov, skozi katere je prehod učinkovine opisan s setom diferencialnih enačb 1. reda (Slika 1). Kolon v prvotnem modelu služi samo kot rezervoar. Model sloni na naslednjih predpostavkah:

- absorpcija iz želodca in kolona je nepomembna v primerjavi s tankim črevesom,
- prehod skozi membrano tankega črevesa je pasiven,
- raztapljanje učinkovine je takojšnje,
- pot zdravila skozi tanko črevo lahko opišemo kot proces, ki poteka skozi serijo prostorov, pri čemer je vsak opisan z linearno kinetiko;
- prostori imajo lahko različne volumne in pretoke,
- čas prehoda je enak skozi vse prostore (7).



Slika 1: Shematski prikaz CAT modela. Prirejeno po Yu Y. Lawrence, Amidon I. Gordon (7)

Tako lahko prehod skozi gastrointestinalni trakt opišemo s sledečimi enačbami:

$$\text{Želodec: } \frac{dM_s}{dt} = -K_s M_s \quad (\text{Enačba 1})$$

$$\text{Tanko črevo: } \frac{dM_n}{dt} = K_t M_{n-1} - K_t M_n \quad n=1,2,\dots,7 \quad (\text{Enačba 2})$$

$$\text{Kolon: } \frac{dM_c}{dt} = K_t M_N \quad (\text{Enačba 3})$$

Pri čemer je M_s količina učinkovine v želodcu, M_c količina učinkovine v kolonu in M_n količina učinkovine v n -tem prostoru tankega črevesja, t čas, K_s , K_t , konstanti praznjenja želodca in prehoda tankega črevesa. Pri enačbi 2, ko je $n=1$, nadomestimo $K_t M_0$ s $K_s M_s$.

Hitrost absorpcije iz tankega črevesa v plazmo opišemo z enačbo:

$$\frac{dM_a}{dt} = K_a \sum_{n=1}^7 M_n \quad (\text{Enačba 4})$$

pri čemer je K_a konstanta absorpcije in M_a količina absorbirane učinkovine. Iz masne bilance sledi:

$$M_s + \sum_{n=1}^7 M_n + M_c + M_a = M_0 \quad (\text{Enačba 5})$$

Ko gre $t \rightarrow \infty$, M_s in M_n dosežeta vrednosti nič, iz česar sledi $M_c + M_a = M_0$.

Delež absorpcije tako lahko ocenimo:

$$F_a = \frac{M_a}{M_0} = \frac{1}{M_0} \int_0^{\infty} K_a \sum_{n=1}^7 M_n dt \quad (\text{Enačba 6})$$

Po rešitvi enačbe in ko vstavimo Enačbo 1 in 2 dobimo:

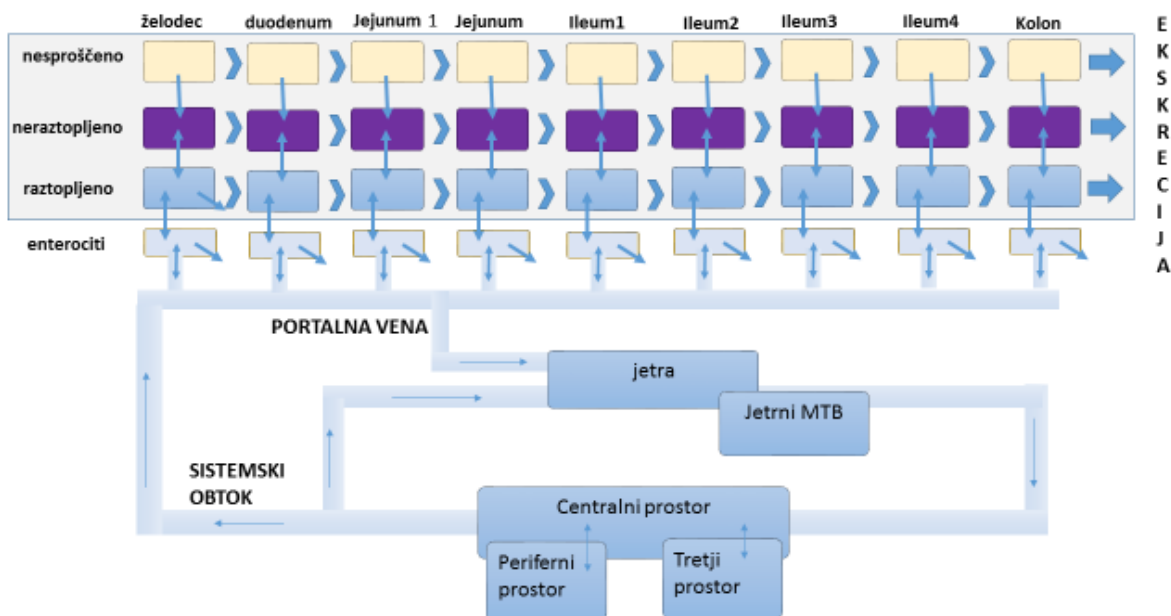
$$Fa = 1 - \left(1 + \frac{Ka}{Kt}\right)^{-7} \quad (\text{Enačba 7})$$

(7).

1.3 ACAT model

Napredni prostorski absorpcijski in tranzitni (ang. Advanced compartmental absorption and transit, ACAT) model sloni na osnovah CAT modela, vključuje pa metabolizem prvega prehoda in absorpcijo preko kolona (8).

Model nadgrajuje CAT model, saj slednji ne vključuje končne hitrosti, pH odvisne topnosti učinkovin, kontroliranega sproščanja, absorpcije v želodcu ali kolonu, metabolizma v črevesju, aktivnega transporta preko prenašalcev in drugih faktorjev v prebavnem traktu. Absorpcija v kolonu je v veliko primerih zanemarljiva, a v nekaterih primerih formulacij s takojšnjim sproščanjem in pri večjemu številu formulacij s kontroliranim sproščanjem predstavlja pomemben doprinos k celotni absorpciji (9).



Slika 2: Shematski prikaz ACAT modela. Prirejeno po Huang W. (8)

ACAT model je sestavljen iz devetih prostorov, pri čemer je vsak razdeljen na štiri podprostore; nesproščeno, ne-raztopljeno in raztopljeno učinkovino ter enterocite (Slika 2). Podprostor z nesproščeno učinkovino se uporablja samo v primeru formulacij s kontroliranim sproščanjem. Učinkovina se lahko sprosti iz formulacije kot raztopina (podprostor z raztopljeno učinkovino) ali v obliki trdih delcev (podprostor z neraztopljeno učinkovino). Učinkovina nato potuje po gastrointestinalnem traktu do kolona, če se prej ne absorbira s prehodom prvega reda. Absorpcija je definirana s prehodom učinkovine v enterocite. V enterocitih potekajo efluks učinkovine, bazolateralni transport in metabolični procesi. Ko učinkovina doseže bazolateralno intestinalno bariero, pride do portalne vene in nato v jetra. Učinkovina, ki se izogne metabolizmu preide v sistemski obtok, od kjer se lahko razporedi v periferne prostore ali različna tkiva. Do ledvične in drugih načinov eliminacije pride iz centralnega prostora. Puščice na shemi označujejo procese, vsaka puščica označuje drugo enačbo. Vsi procesi so linearni (prvega reda) z izjemo raztapljanja, transporta s prenašalci, metabolizma v prebavnem traktu in jetrnega metabolizma (9).

1.4 Program GastroPlus™

GastroPlus™ je komercialno dostopen program, ki ga je razvilo podjetje Simulations Plus Inc. Model, na katerem bazira je ACAT, ki pa je nekoliko modificiran, tako da je napovedovanje absorpcije izboljšano. Vse podrobnosti modela žal niso razkrite, zaradi komercialne narave programa. Z GastroPlus™ lahko s pomočjo *in vitro* podatkov ustvarimo *in vivo* absorpcijski profil in ugotovljamo *in vivo-in vitro* korelacije (8).

GastroPlus™ lahko simulira intravensko, gastrointestinalno, okularno, nazalno in pulmonalno absorpcijo ter farmakokinetiko. Omogoča opis farmakokinetike učinkovin z eno, dvo ali triprostorskim farmakokinetičnim modelom ali pa s fiziološkimi farmakokinetičnimi modeli.

Razvijalci GastroPlus™ predlagajo različne mogoče načine uporabe programa v razvoju zdravil. V odkrivanju zdravilnih učinkovin ga lahko uporabljamo za napovedovanje obsega in hitrosti absorpcije iz *in vitro* podatkov. Tako lahko že v začetnih fazah razvoja zdravila ocenimo absorpcijo, metabolizem in toksičnost učinkovine, ki so poleg jakosti pomembne za odločitev o nadaljnjem razvoju zdravila. Pri odkrivanju zdravilnih učinkovin se raziskovalci pogosto srečujejo z večjim številom učinkovin in z omejenimi sredstvi za

njihov razvoj. S pomočjo različnih orodij in programov, kot je GastroPlus™, si lahko olajšamo odločitve o nadaljnjem razvoju. Drug pristop, ki nam ga program ponuja je občutljivostna analiza (ang. parameter sensitivity analysis), s pomočjo katere lahko ocenimo občutljivost predvidene absorpcije in farmakokinetike na ključne vhodne parametre, kot na primer topnost ali permeabilnost učinkovine. Tako v primeru, da je kritičen faktor topnost, lahko usmerimo razvoj v povečanje le-te. Podobno lahko program uporabljamo v predkliničnem in kliničnem razvoju za izbor optimalne formulacije, odmerka, oceno kontroliranega sproščanja. V tej fazi lahko na podlagi izmerjenih plazemskih koncentracij učinkovine pri testnih osebah izgradimo model, specifičen za učinkovino in s pomočjo modeliranja optimiziramo formulacijo za doseganje željenih koncentracijskih profilov. Spremljamo lahko tudi posledice spreminjanje povprečne velikosti delcev oz. spremembe distribucije velikosti delcev. Takšne modele uporabljamo tudi za predvidevanje absorpcije in farmakokinetike različnih odmerkov učinkovine, iz različnih formulacij, za analize občutljivosti in populacijske simulacijske študije.

Program vsebuje funkcijo populacijski simulator, s pomočjo katere lahko izvedemo serijo simulacij na različnih osebah, ki so opisane kot naključni vzorec fizioloških (čas prehoda skozi različne prostore, pH prostora) in farmakokinetičnih parametrov (vezava na plazemske proteine, koncentracijsko razmerje kri-plazma, ledvični očistek, itd.) ter formulacijskih variabilnosti (masa, premer, itd.), ki posnemajo variance kot jih pričakujemo pri realnih formulacijah. Tako lahko ocenimo kombinirani učinek več spremenljivk. Distribucija spremenljivk je lahko normalna, log-normalna ali enakomerna, definirane pa so kot povprečja s koeficientom variance. Rezultat populacijske simulacije je povprečje, koeficient variabilnosti in 90% interval zaupanja za obseg systemske absorpcije, delež odmerka, ki doseže portalno veno, Tmax, Cmax in AUC kot tudi minimalne in maksimalne vrednosti le-teh. S funkcijo lahko preučujemo tudi koncentracijo učinkovine v tarčnem tkivu in farmakodinamične učinke (9).

1.5 Bioekvivalenčne raziskave

Generična zdravila so zdravila, ki so bistveno podobna inovativnemu zdravilu in imajo kakovostno in količinsko enakovredno sestavo učinkovine, ki je v enaki farmacevtski obliki in ki jim je dokazana bioekvivalenca, dokler se znanstveno ne dokaže pomembna razlika glede varnosti in učinkovitosti. Dve zdravili sta bioekvivalentni, kadar imata enako biološko uporabnost. To pomeni, da procesi sproščanja, absorpcije in predsystemskega

metabolizma potekajo enako hitro in v enakem obsegu pri enakem stanju bolnika. Za ugotavljanje bioekvivalence primerjamo farmakokinetične profile učinkovine v plazmi oziroma urinu. Najpogosteje bioekvivalenco ugotavljamo na osnovi časovnega poteka plazemskih koncentracij učinkovine, ugotovljenih po enkratnem dajanju zdravila. Primerjamo AUC, površino pod krivuljo plazemskih koncentracij, in C_{max} , maksimalno koncentracijo učinkovine v plazmi. Alternativno lahko bioekvivalenco merimo na podlagi večkratne aplikacije zdravila, takrat merimo AUC in $PTF = (C_{max} - C_{min})/C_{pov}$, s katerim merimo nihanje v stacionarnem stanju (ang. Peak trough fluctuation), ki je merilo za hitrost prehoda učinkovine v centralni krvni obtok. Tak način je potreben, ko procesi sproščanja, absorpcije in predsistemskega metabolizma potekajo z nelinearno kinetiko, ko so koncentracije učinkovine po enkratnem odmerku prenizke za uspešne meritve in ko je intraindividualna variabilnost manjša pri stacionarnem stanju kot enkratnem odmerku. Tretji, redkejši način je merjenje količin učinkovine v urinu, ko merimo A_e , delež odmerka izločenega v urinu in dA_e/dt , hitrost izločanje učinkovine v urin (10).

Statistično ugotavljamo bioekvivalenco glede na 90% interval zaupanja za razmerje izmerjenih parametrov med testnim in referenčnim zdravilom, ki mora biti v intervalu med 80.00 do 125.00%. Farmakokinetični parametri morajo biti analizirani z ANOVA testom (11).

Za raziskave biološke uporabnosti je priporočeno, da so zasnovane kot primerjalne, randomizirane študije z dvema periodama in dvema sekvencama. Število osebkov se razlikuje, od minimalno 12, do običajnih 24 lahko pa tudi do 100. Vzorec mora bazirati na izračunu velikosti vzorca, ki zagotavlja ustrezno moč testa (10; 11).

Navadno primerjamo testno formulacijo T z inovatorjevo/referenčno formulacijo R, na skupini zdravih osebkov med 18 – 55 let, pri čemer vsak osebek dobi testno in referenčno zdravilo ločeno z dobo izpiranja. Navadno dobi ena skupina najprej zdravilo T in nato R in druga obratno, da se lahko preveri značilnost vpliva periode in sekvence. Ker je intraindividualna variabilnost farmakokinetike v primerjavi z interindividualno veliko manjša (običajno okoli 15%), se navadno priporoča navzkrižni načrt (12).

Bioekvivalenca je ugotovljena glede na meritve koncentracije osnovne zdravilne učinkovine (ang. parent compound), ne njenih metabolitov, tudi v primeru predzdravil. Meritve metabolitov niso priporočljive, lahko jih uporabimo le v izjemnih primerih, ko

lahko le-te upravičimo v primeru, da analitične metode ne dopuščajo zanesljivih meritev osnovne učinkovine, kar pa ni pogosto (11).

Bioekvivalenčne študije izvajamo v treh različnih primerih: ko želimo na trg z drugačno farmacevtsko obliko, kot je bila uporabljena v kliničnih študijah, ko pride do sprememb v proizvodnji formulacije in ko želimo na trg sprostiti novo generično zdravilo (12).

1.6 Simulacije bioekvivalenčnih raziskav

V generični industriji je uporaba orodij za simulacijo farmakokinetike nekoliko drugačna kot pri razvoju novih zdravil. Ključna razlika je v tem, da imamo pri razvoju generičnih zdravil že na voljo podatke o fizikalno kemijskih lastnostih učinkovin, farmakokinetičnih lastnostih in formulacijskih lastnostih. Te lahko uporabimo kot vhodne podatke za model, ki ga navadno kalibriramo in validiramo s farmakokinetičnimi podatki pridobljenimi s študijami na ljudeh (13).

Simulacija predstavlja poenostavljeno pot do odgovorov na vprašanja, kadar smo časovno ter stroškovno omejeni in za boljše načrtovanje bioekvivalenčnih študij. Modeliranje in simulacije so tudi zaželeni pri oblikah, ki niso za peroralno aplikacijo in kompleksnih produktih, kjer se konvencionalni načini dokazovanja bioekvivalence ne obnesejo (14).

Ob vse večjem številu komercialno dostopnih mehanističnih absorpcijskih modelov, se raziskuje uporaba le-teh v iskanju odgovora na različne znanstvene izzive. Navkljub temu pa je število publikacij na temo simulacij bioekvivalenčnih raziskav precej omejeno (14).

V nadaljevanju je predstavljen povzetek nekaj člankov, ki so nam služili kot izhodišče te magistrske naloge.

1. *J. R. Crison et al., Biowaiver approach for biopharmaceutics classification system class 3 compound metformin hydrochloride using in silico modeling. J Pharm Sci 101, 1773-1782 (2012).*

Crison in sodelavci so preučevali uporabo računalniškega modeliranja za namene opustitve bioekvivalenčne študije (ang. biowaiver) za zdravilo z metforminom, ki je primer BCS III, dobro topne, slabo permeabilne učinkovine. Pristop dovoljuje odobritev zdravila le na podlagi *in vitro* študij sproščanja. S tem se izognemo kliničnim bioekvivalenčnim študijam. Opustitev bioekvivalenčne študije je dovoljena le v primeru BCS I učinkovin

(EMA izjemoma dovoljuje tudi za BCS III, pri zelo hitrem raztapljanju, vsaj 85% raztopljene učinkovine v 15 minutah pri širokem razponu pH). Avtorji se v članku sprašujejo o smiselnosti takšne omejitve in ugotavljajo možnost istega pristopa tudi za BCS III, saj je absorpcija enako kot pri BCS I omejena s časom prehoda učinkovine skozi prebavni trakt in ne z raztapljanjem učinkovine.

Za gradnjo za učinkovino specifičnega modela so uporabili literaturne podatke za metformin. Permeabilnost je bila prilagojena tako, da je ustrezala kliničnim podatkom, ostali fiziološki parametri pa so ostali na prednastavljenih vrednostih. Za razvoj modela so uporabili podatke iz dveh kliničnih študij za formulacijo s takojšnjim sproščanjem in dve študiji (ena s takojšnjim sproščanjem in ena s podaljšanim) za validacijo modela, tako da so zagotovili, da model zagotavlja napovedljivost za velik razpon hitrosti sproščanja učinkovine.

Za simulacije bioekvivalenčnih študij so uporabili modul Virtualni poizkusi v programu GastroPlus™. Koeficiente variacije, KV so prilagodili tako da so se ujemali z variabilnostmi v kliničnih študijah (očistek, volumen distribucije, teža oseb itd.), kar je rezultiralo v podobnem KV za Cmax in AUC. Število oseb v virtualni študiji je bilo enako kot v klinični študiji. Bioekvivalenca med testnim in referenčnim produktom je bila izračunana na podlagi AUC_{0-t} in Cmax kot povprečna bioekvivalenca s programom Win-Nonlin za računanje bioekvivalenčne statistike. Testna formulacija je bila rezultat virtualne študije, referenčna pa klinične študije. Kot testne formulacije so uporabili hipotetične, simulirane profile sproščanja, pri katerih se je 100% metformina sprostilo v območju med t = 5 minut do 10 h. Bioekvivalenco so potrdili pri formulacijah s sproščanjem 100% metformina med 5 min in 2 h, nad 2h pa formulacije niso bile več bioekvivalentne (15).

2. A. H. Babiskin, X. Zhang, *Application of Physiologically Based Absorption Modeling for Amphetamine Salts Drug Products in Generic Drug Evaluation. J Pharm Sci* 104, 3170-3182 (2015).

Raziskovalca Ameriške agencije za zdravila, FDA, Babiskin in Zhang sta modelirala plazemske koncentracijske profile amfetaminskih soli. Kombinacija amfetaminskih soli je v zdravilih za zdravljenje, motnje pozornosti s hiperaktivnostjo (ang. Attention deficit hyperactivity disorder, ADHD). Podatke za farmakokinetični model so črpali iz dokumentacije za pridobitev dovoljenja za promet z novim zdravilom (ang. new drug application, NDA). Osnova je bila per os oblika. Kombinacije amfetaminskih soli v

zdravilu (Aderall®) vsebuje štiri različne učinkovine, če upoštevamo tudi različne enantiomerne oblike. Da bi model poenostavili, so se odločili v GastroPlus™ osnovati model na dveh učinkovinah; D-amfetamin in L-amfetamin. Pri simulaciji je bilo odmerjanje določeno na vsake 4 ure. Za namene virtualne študije so izdelali farmakokinetične profile za 2000 subjektov, 1000 za vsako formulacijo (testno in referenčno). Parametri za vsak osebek so bili generirani z naključnim vzorčenjem iz log-normalno distribucijo. Koeficient variacije so interpretirali kot intrasubjektivno variabilnost KV in ga arbitrarno postavili na 10% za večino parametrov, saj le-ti podatki za večino fizioloških parametrov niso znani. Nato so iz 1000 generiranih profilov jemali vzorce z različnim številom oseb, n=12, 24, 36, 48, 72. Ker so KV interpretirali kot intrasubjektivno variabilnost, je bil načrt BE študije navzkrižen in so se odločili določevati povprečno bioekvivalenco za analizo relevantnih farmakokinetičnih parametrov. Če so vsi BE parametri, C_{max} in AUC, dosegli predpisani 90% interval zaupanja za bioekvivalenčne kriterije, je bila študija označena kot uspešna. Študija je bila ponovljena tisočkrat in nato na podlagi tisočih simuliranih študij izračunano razmerje uspešnosti. Namesto, da bi izvedli samo eno virtualno študijo in na podlagi le-te določali bioekvivalenco, so torej izvedli tisoč virtualnih študij in izračunali verjetnost bioekvivalence in s tem minimalizirali možnost napačnih zaključkov (16).

3. *Simulations Plus Inc, White Paper: Applying GastroPlus™ for Extensions of Bioequivalence for BCS Class II Compounds, 2015.*

Raziskovalci podjetja Simulations Plus, Inc so izdali poročilo, v katerem demonstrirajo možnost uporabe programa GastroPlus™ za opustitev bioekvivalenčne študije pri zdravilu z učinkovino BCS II (nizka topnost, dobra permeabilnost), zaradi spremembe pri procesu pridobivanja učinkovine. V postopku kristalizacije so dodali korak mletja kot del izboljšanja procesa pridobivanja zdravilne učinkovine in tako zagotovili pridobivanje bolj ozke porazdelitve velikosti delcev. Dokazati je bilo potrebno, da spremembe v proizvodnji niso pomembno vplivale na biološko uporabnost in bioekvivalenco zdravila. Namesto izvedbe dodatnih kliničnih študij so to skušali dokazati s simulacijami virtualnih bioekvivalenčnih študij.

Odločili so se za simulacijo navzkrižne bioekvivalenčne študije, pri čemer so simulirali 10 različnih populacij, v vsaki je bilo 25 oseb. Isto populacijo so uporabili tako za referenčno kot tudi testno formulacijo. Variabilnost subjektov so določili s pomočjo

podatkov iz kliničnih študij, kjer pa to ni bilo možno, je bila variabilnost enaka prednastavljeni v programu GastroPlusTM. Intrasubjektivno variabilnost so pridobili tako, da so simuliranim plazemskim profilom dodali še naključno variabilnost KV=15% (17).

4. *Y. Tsume, G. L. Amidon, The biowaiver extension for BCS class III drugs: the effect of dissolution rate on the bioequivalence of BCS class III immediate-release drugs predicted by computer simulation. Mol Pharm 7, 1235-1243 (2010).*

Tsume in Amidon sta ocenjevala izvedljivost opustitve bioekvivalenčne študije za učinkovine BCS III. Zato sta izbrala pet modelnih učinkovin: propranolol in metoprolol, kot primera učinkovin BCS I ter cimetidin, atenolol in amoksisicilin, kot primere učinkovin BCS III. Uporabila sta prednastavljene fiziološke parametre v programu GastroPlusTM. Odmerek, volumen tekočine ob zaužitju zdravila, molekulska masa, log P, Pka, gostota delcev in difuzijski koeficient so bili fiksni parametri, vsi ostali pa variirali s KV med 10-20%. ACAT model so prilagodili tako, da so se učinkovine BCS I absorbirale v celotnem tankem in debelem črevesu, ne pa tudi v želodcu, medtem ko so pri učinkovinah BCS III predvidevali absorpcijsko okno v proksimalnem delu črevesja, duodenumu in jejunumu, izključili pa so absorpcijo v ileumu, želodcu in debelem črevesju. Virtualne bioekvivalenčne študije so izvedli v treh različnih fazah MMC cikla in za dva različnih volumna zaužite tekočine ob odmerjanju (50 in 200 ml). Virtualne študije so izvedli na vzorcu n=500 osebkov za referenco za vsako učinkovino in testne študije s n=24 osebki z različnimi profili sproščanja učinkovine, s 85% sproščene učinkovine v časih od $T_{85\%} = 15$ min do $T_{85\%} = 180$ minut. Rezultate so nato primerjali in ugotavljali bioekvivalenco med različnimi formulacijami. Pri učinkovinah BCS I so v referenčni študiji določili sproščanje $T_{85\%} = 30$ min. Sprememba hitrosti sproščanja do $T_{85\%} = 120$ minut ni imela vpliva na bioekvivalenco različnih vzorcev, zaradi visoke permeabilnosti skozi celoten gastrointestinalni trak. Pri učinkovinah BCS III so za referenčni vzorec vzeli hitrost sproščanja $T_{85\%} = 15$ min. Cimetidin in atenolol sta izkazala bioekvivalenco do hitrosti sproščanja $T_{85\%} = 60$ min, amoksisicilin pa do hitrosti sproščanja $T_{85\%} = 45$ min. Zaradi slabše permeabilnosti učinkovin BCS III je v smernicah kriterij za hitrost sproščanja strožji kot pri učinkovinah BCS I, kar je skladno z opisanimi rezultati simulacije učinkovinah (18).

1.7 Acetilsalicilna kislina

Kot modelno učinkovino za simulacije bioekvivalenčnih raziskav smo v tem magistrskem delu uporabili acetilsalicilno kislino. Acetilsalicilna kislina (ASA), ki jo poznamo pod lastniškim imenom Aspirin, je na trgu kot zdravilo že od leta 1899. Uporabljamo jo v analgetične, antipiretične in antiinflamatorne namene. Pri odraslih se uporablja za blaženje blažjih do srednjih bolečin, kot so glavobol, dismenoreja, mialgija in zobobol. Prav tako se uporablja pri revmatičnih obolenjih za blaženje bolečine in vnetja ter zniževanje telesne temperature pri prehladu in gripi. Acetilsalicilna kislina deluje tudi antitrombotično in jo uporabljamo pri zdravljenju kardiovaskularnih bolezni in preprečevanju srčnega infarkta, možganske kapi ter drugih kardiovaskularnih zapletov. Uporaba acetilsalicilne kisline je kontraindicirana pri otrocih zaradi Reyevega sindroma. Acetilsalicilna kislina se v organizmu presnavlja v salicilno kislino, ki je aktivni metabolit. Običajni odmerek je 300 - 1000 mg v enkratnem odmerku, maksimalni odmerek pa 3 – 4 g. Interval odmerjanje je navadno 4 - 8h, prilagojeno potrebam.

Učinkovina se običajno aplicira peroralno kot kislina v prosti obliki, poznamo pa tudi različne soli in estre. Slednji se uporabljajo predvsem topikalno. ASA je šibka kislina, zato je njena topnost odvisna od pH (19).

ASA je dobro topna in dobro permeabilna učinkovina, tako da jo po biofarmaceutskem klasifikacijskem sistemu uvrščamo med BCS I učinkovine. Prisoten je predsistemski metabolizem v jetrih in pa tudi v črevesju, ki ga povzročijo nespecifične esterase v črevesni steni. Ocenili so, da le 68% acetilsalicilne kisline pride v sistemski krvni obtok nehidrolizirane (19).

2 NAMEN

Bioekvivalenčne raziskave so pomemben del razvoja generičnih zdravil, saj z njimi dokazujemo, da se učinkovina v generičnem zdravilu sprošča v enakem obsegu in enako hitro kot pri originalnemu zdravilu. Bioekvivalenčne študije predstavljajo tudi večji finančni strošek v razvoju in so ključne za registracijo zdravil na trgu. Neuspešna študija bi tako pomenila velik finančni strošek in kar je še pomembneje, izgubo časa, saj bi v tem primeru bilo potrebno celotno študijo ponoviti. Vemo pa, da je v razvoju generičnih zdravil zelo pomembno, kdo bo prišel na trg prvi, saj je od tega odvisen delež trga, ki ga bo zdravilo osvojilo. Iz teh razlogov si farmacevtska industrija prizadeva, s pomočjo različnih metod in orodij, čim bolje napovedati kakšen bo rezultat bioekvivalenčnih študij. S pojavom različnih komercialno dostopnih simulacijskih programov se tako ponuja možnost simulacij bioekvivalenčnih študij s fiziološkimi farmakokinetičnimi modeli, s katerimi si želimo napovedati izid bioekvivalenčnih raziskav.

V nalogi želimo razviti metodologijo simuliranja bioekvivalenčnih raziskav, ki bo splošno uporabna kot orodje pri načrtovanju bioekvivalenčnih raziskav za različna zdravila v razvoju.

Problema se bomo lotili s pregledom literature in poiskali poročila o že izvedenih simulacijah bioekvivalenčnih študij. Nekaj glavnih metod simulacij bioekvivalenčnih študij iz literature je bilo že predstavljenih v Uvodu.

Na podlagi že objavljenih metodologij bomo razvili izboljšano metodologijo simulacij bioekvivalenčnih študij. Metodologijo bomo preizkusili na modelni učinkovini, acetilsalicilni kislini.

3 METODE

3.1 PROGRAMSKA ORODJA

Za simulacijo bioekvivalenčnih študij smo uporabili program Gastroplus™. Obdelava podatkov in vzorčenje je potekalo s programom Microsoft Office Excel, računanje bioekvivalenčne statistike pa v okolju R s paketom BEAR.

3.2 RAZVOJ FIZIOLOŠKEGA FARMAKOKINETIČNEGA MODELA

Za izvedbo simulacij s programom Gastroplus™ je potrebno najprej izgraditi model, ki opisuje obnašanje farmacevtske oblike v človeškem telesu.

Izgradnja modela navadno poteka v naslednjih korakih:

1. Zbiranje podatkov o zdravilu: podatki o formulaciji, fizikalno kemijskih lastnostih.
2. Izgradnja farmakokinetičnega modela: Če so na voljo podatki o farmakokinetiki pri človeku, če ne *in vitro* ali podatki iz meritev na živalih.
3. Optimiziranje vhodnih podatkov modela, tako da zagotovimo ustreznost modela.
4. Validacija modela, s katero potrdimo ustreznost modela.
5. Uporaba modela (3).

Za predvidevanje absorpcije moramo v program vnesti fizikalno-kemijske lastnosti učinkovine, fiziološke parametre, ki opisujejo gastrointestinalni trakt izbrane živalske vrste (v našem primeru človeka), odmerek, farmacevtsko obliko, čas simulacije.

3.2.2 Podatki o učinkovini in farmacevtski obliki

Prvi korak pri izgradnji modela je vnos fizikalno-kemijskih lastnosti učinkovine kot so molekulska masa, log D in pKa. Dodatno smo vnesli literaturne podatke o topnosti acetilsalicilne kisline pri različnih pH in prilagodili vgrajen pKa model topnosti na izmerjene podatke. Tako dobimo boljšo ekstrapolacijo podatkov tam, kjer eksperimentalni podatki niso na voljo. Na podlagi parametra logP program oceni krivuljo logD v odvisnosti od pH, kar nato uporabi za izračun ASF (ang. absorption scale factors), ki prilagodijo črevesno permeabilnost.

Program nam omogoča tudi simulacije za različne farmacevtske oblike: intravenske oblike, oblike s takojšnjim sproščanjem, oblike z zakasnelim sproščanjem, oblike s kontroliranim sproščanjem, okularne oblike, nazalne oblike in mešane večkratne odmerke (pri katerih lahko simuliramo različne oblike z različnimi intervali sproščanja).

Vnesti moramo tudi začetni odmerek v mg, interval odmerjanja v urah in volumen tekočine pri zaužitju zdravila v mL, torej količino zaužite vode ob jemanju zdravila. Ta količina je dodana volumnu tekočine v želodcu na začetku simulacije in vpliva samo na volumen tekočine v želodcu, ne pa na volumen tekočine v preostanku gastrointestinalnega traku. Program izračuna pH iz modelirane krivulje topnost odvisna od pH. Topnost sicer program prevzame iz podatkov topnost-pH, ki smo jih vnesli posebej v sistem.

Delci učinkovine so definirani z gostoto in velikostjo. Definiramo velikost delcev in distribucijo, ki je lahko normalna, log-normalna in število velikostnih razredov delcev, ki jih program uporabi pri simulaciji. Lahko pa tudi zadržimo konstanten radij v vsakem razredu. V našem primeru smo uporabili samo en razred velikosti delcev in zagotovili konstanten radij.

Program izračuna difuzijski koeficient na podlagi molekulske mase.

Za izračun permeabilnosti moramo programu ponuditi vrednost izmerjene permeabilnosti in izvor podatkov. Program nato pretvori podatke iz meritev na različnih živalskih oziroma celičnih vrstah. Mi smo za oceno permeabilnosti acetilsalicilne kisline uporabili meritve na Caco-2 celičnih linijah, ki smo jih z vgrajenim modelom v programu GastroPlusTM pretvorili v vrednosti permeabilnosti pri človeku.

3.2.3 Podatki o fiziologiji prebavnega trakta

V naslednjem koraku pridemo do Fiziologije, kjer lahko uravnavamo več parametrov za vseh devet prostorov črevesja: dolžino, radij, čas prehoda, pH, encime in transporterje in ASF. Efektivno permeabilnost lahko nastavljamo za vsak prostor posebej, vendar teh podatkov navadno nimamo na voljo, zato smo uporabili kar zgoraj omenjeno vrednost Peff za učinkovino v vseh prostorih črevesja.

ASF, »absorption scale factors«, je pomnožitveni faktor, s katerim prilagajamo permeabilnost v posameznih delih črevesja, in opisuje različne faktorje, ki lahko vplivajo na absorpcijo učinkovine od enega črevesnega prostora do drugega. To so pH, oblika in

velikost molekule, kisle in bazične skupine na molekuli, razmerje površina/volumen, pH efekti in ostali efekti, ki vplivajo na različno absorpcijo od enega črevesnega prostora do drugega. ASF faktorji so izračunani iz vgrajenega GastroPlus™ modela, ki vsebuje parametre C1-C4. Te parametre C1 do C4 smo v našem primeru pridobili z Optimizacijskim modulom, ki avtomatično prilagodi faktorje, tako da čim boljše ustrezajo našim podatkom. C1 in C2 sta faktorja, ki opisujeta dogajanje v tankem črevesu, C3 in C4 pa v kolonu. Program ima na voljo 9 različnih ASF modelov, mi smo za našo raziskavo izbrali Opt logD Model SA/ V 6.1, katerega splošne vrednosti za permeabilnost, ki so določene glede na permeabilnost in absorpcijo večjega seta zdravilnih učinkovin smo nato še optimizirali.

Privzeta vrednost za povprečni čas prehoda skozi želodec je 0,25 ure. V primeru raztopin, suspenzij, kapsul pa je čas prehoda priporočeno zmanjšati na 0,1 ure ali manj.

3.2.4 Farmakokinetični parametri

Nato moramo določiti farmakokinetične lastnosti modela. Odstotek učinkovine, ki je izločena v jetrih, preden pride v sistemski obtok določimo s parametrom %FPE. Vnesemo tudi razmerje koncentracije kri/plazma, s faktorjem Use Exp Plasma Fup [%], ki opisuje procent učinkovine, ki ni vezan na plazemske proteine. Nastavimo še očistek, distribucijski volumen in distribucijske konstante, v kolikor uporabljamo večprostorski model. Vrednosti farmakokinetičnega modela smo v našem primeru pridobili z modulom PKPlus iz podanih plazemski profilov acetilsalicilne kisline. Ta modul nam omogoča prilagajanje eno-, dvo- ali triprostorskega farmakokinetičnega modela na izmerjeni plazemski profil učinkovine. Na podlagi rezultatov smo nato videli, kateri farmakokinetični model najbolj ustreza našim podatkom.

Po vnosu teh parametrov lahko začnemo izvajati simulacije s programom GastroPlus™.

Ker smo izvajali populacijske simulacije na večjem številu oseb, smo morali še dodatno nastaviti lastnosti populacije in število oseb, ki jih želimo vključiti v študijo (9).

V tem magistrskem delu smo kot modelno učinkovino uporabili acetilsalicilno kislino. Model smo v veliki meri izgradili na podlagi podatkov, pridobljenih iz literature. Parametri modela in evalvacija so opisani v poglavju Rezultati in razprava.

3.3 RAZVOJ METODE SIMULACIJ BIOEKVIVALENČNIH RAZISKAV

Da bi našli primerno metodo za simulacijo bioekvivalenčnih študij smo se odločili sprva raziskati literaturo, ki je na voljo in opisuje izvedbo podobnih študij.

Pomembnejši članki in metode izvedbe simulacije bioekvivalenčne raziskave so opisane v Uvodu. Po pregledu metod, ki smo jih našli pri pregledu literature, smo na podlagi le-teh razvili lastno metodologijo za simulacije bioekvivalenčnih študij.

Crison in sodelavci so v članku za simulacijo virtualnih študij le-te zagnali samo enkrat za vsako formulacijo. Da bi vključili interindividualno variabilnost v simulacije, so prilagodili KV parametre modela, tako da je ustrezal variabilnosti opaženi v klinični študiji, s katero so primerjali podatke. Nikjer ni omenjena intraindividualna variabilnost, za katero ni jasno kako so jo upoštevali pri bioekvivalenčnem izračunu.

Babiskin in sodelavci so za razliko simulacijo študije izvedli tisočkrat, z izbranimi vzorci iz populacije 1000 ljudi. Za simulacijo so uporabili program GastroPlusTM. Simulacije za testno in referenčno zdravilo so izvedli na različnih osebah simuliranih z »Virtual Trials« modulom, ne pa na povsem istem osebku s povsem istimi vrednosti vseh parametrov. Pri izdelavi populacije so KV arbitrarno nastavili na 10% za večino parametrov. Razlike v fiziologiji in farmakokinetiki v celoti interpretirajo kot intraindividualno variabilnost. Tako nikjer ne upoštevajo interindividualne variabilnosti, kar vidimo kot pomanjkljivost metode. Tako so se odločili namerno, zaradi poenostavitve metode, saj program GastroPlusTM ne omogoča direktnega dodajanja KV na rezultate in nato računanje bioekvivalenčne statistike. Študijo so ponovili tisočkrat, tako da so izračunali verjetnost uspešnosti bioekvivalenčne študije in se niso zanašali samo na rezultat enkratne ponovitve.

Raziskovalci podjetja GastroPlusTM so se v svoji študiji problema lotili nekoliko drugače, saj so za vse formulacije izvedli virtualne raziskave z istimi ljudmi in s tem zajeli interindividualno variabilnost. Nato so rezultatom dodali še intraindividualno variabilnost KV 15%. Intraindividualno variabilnost so dodali na vse točke plazemskega profila. Pri razvoju naše metode se nam je zdelo pravilneje dodajati intraindividualno variabilnost le na parametra AUC in Cmax, saj je taka variabilnost običajno poročana pri rezultatih bioekvivalenčnih študij in relevantna za izračun bioekvivalenčne statistike. Izdelali so

deset bioekvivalenčnih študij, kar je precej manj kot Babiskin v ugotavljanju verjetnosti uspešnosti študij.

Po pregledu metod in ugotavljanju njihovih prednosti in pomanjkljivosti, smo se odločili združiti dobre prakse metodologije, ki smo jih našli v različnih člankih in smo razvili izboljšano metodo.

Odločili smo se, da bomo za našo študijo izdelali populacijske profile za 1000 oseb. Ti profili opisujejo našo populacijo, na kateri smo nato izvajali navzkrižne študije. Parametrov, ki so definirani za vsak profil je skupno kar 85, večina teh se nanaša na fiziološke lastnosti, nekaj pa tudi na lastnosti formulacije (odmerek, premer, oblika). Parametri so imeli različne koeficiente variance, od 3 do 40 % (večina 10%), njihova porazdelitev pa je bila logaritemsko normalna. Parametri, ki so vključeni v profile in njihova varianca so vključeni v Prilogi II. Program nam v poročilu poda pregled nad najnižjo, najvišjo in povprečno vrednostjo, ki jo je izdelal. Variabilnost na parametrih smo tretirali kot interindividualno variabilnost.

Program omogoča izvedbo navzkrižnih študij, saj lahko uporabimo isto populacijo za virtualno simulacijo plazemskih profilov različnih formulacij. Tako smo vedno znova uporabili isto populacijo in zagnali virtualno simulacijo na 1000 osebkih za vsako izmed naših sedmih formulacij, v časovnem intervalu štirih ur, z 62 točkami vzorčenja.

Postopek smo ponovili za tri različne čase prehoda skozi želodec, $t = 0,10, 0,25, 0,5$ ure.

Program GastroPlus™ nam nato izračuna povprečne vrednosti parametrov AUC, C_{max}, T_{max}, F, žal pa ne izračuna vrednosti parametrov za vsak subjekt posebej, le povprečno za celotno populacijo. Zato smo izvozili plazemske profile iz programa GastroPlus™ in jih uvozili v program Excel, s pomočjo katerega smo izračunali C_{max} in AUC za vsak plazemski profil posebej.

Ob predpostavki, da je variabilnost, ki jo populacijskim parametrom doda GastroPlus™ interindividualna, torej se v naši populaciji nahaja 1000 različnih osebkov, smo, da bi upoštevali še intraindividualno variabilnost naknadno dodali še dodaten šum dobljenim farmakokinetičnim parametrom AUC in C_{max}, ne pa na vsako točko plazemskega profila posebej.

3.3.1 Intraindividualna variabilnost

Po izračunu C_{max} in AUC, ki sta sledila iz simuliranih plazemskih profilov, smo našim podatkom dodali še naključno variabilnost, ki bi nas približala realnim študijam, saj ponazarja intraindividualno variabilnost in eksperimentalno napako.

Predpostavili smo, da je porazdelitev parametrov C_{max} in AUC logaritemsko-normalna. Z intraindividualno variabilnostjo zašumljene vrednosti parametrov C_{max} in AUC smo izračunali s sledečo formulo:

$$C_{max} = C_{max}^{sim} * e^{\eta} \quad (Enačba 8)$$

$$AUC = AUC^{sim} * e^{\eta} \quad (Enačba 9)$$

Tukaj sta C_{max}^{sim} in AUC^{sim} vrednosti dobljeni iz simuliranih profilov, η pa normalno porazdeljena slučajna spremenljivka s povprečno vrednostjo 0 in varianco σ^2 ; $\eta \sim N(0, \sigma^2)$.

Varianca in koeficient variabilnosti sta v sledeči povezavi (za logaritemsko transformirane podatke):

$$\sigma^2 = \ln(1 + KV^2) \quad (Enačba 10)$$

Napako, ki smo jo dodali podatkom smo definirali s koeficientom variabilnosti, ki smo ga želeli doseči. KV, ki sledi iz podatkov iz literature in znaša 15% za AUC in 20% za C_{max} (20). Za potrebe eksperimenta smo bioekvivalenco računali tudi s podvojenim koeficientom variabilnosti, KV 30% za AUC in KV 40% za C_{max} .

Izračunana varianca (σ^2) za AUC znaša 0.149 (pri KV je 15%) in za C_{max} (pri KV je 20%) 0.198.

Spremenljivko η izračunamo kot

$$\eta = Z\sigma \quad (Enačba 11)$$

pri čemer je z standardizirana normalno porazdeljena spremenljivka – $z \sim N(0,1)$.

Spremenljivko zgeneriramo z Box-Mullerjevo metodo za generiranje naključnih spremenljivk s standardizirano normalno distribucijo:

$$Z = \sqrt{-2\ln x_1} \sin 2\pi x_2 \quad (Enačba 12)$$

Pri čemer sta x_1 in x_2 naključni uniformni spremenljivki med (0,1), zgenerirani s programom Excel.

Tako smo za potrebe eksperimenta računali bioekvivalenco s podatki brez dodatne variabilnosti in z dvema setoma podatkov z dodano variabilnostjo na podatkih.

3.3.2 Vzorčenje

Da bi se čimbolj približali realnosti bioekvivalenčnih študij smo se odločili, da bomo računali bioekvivalenco na vzorcih $n = 12, 24$ in 36 subjektov.

Osebe smo izbrali naključno iz populacije 1000 oseb.

Z načinom vzorčenja v programu Excel smo zagotovili, da smo iz seta podatkov zmeraj izbrali rezultate simulacij za isto osebo za naše referenčno in testno zdravilo.

Vzorčenje smo ponovili tisočkrat, tako da smo računali bioekvivalenco na 1000 setih podatkov z n številom oseb.

3.3.3 Izračun bioekvivalenčne statistike

Izračun bioekvivalence je potekal v programskem jeziku R, namenjenemu statističnemu računalništvu in grafiki. R omogoča uporabo raznih statističnih in grafičnih tehnik, ter ga je mogoče razširiti z uporabno dodatnih paketov. (21)

Paket BEAR (BE/BA za R, orodje za analizo povprečne bioekvivalence in biološke uporabnosti) omogoča računanje povprečne bioekvivalence za različne vrste študij. (22)

Pri bioekvivalenčnih študijah dokazujemo, da imata dve zdravili enak obseg (AUC) in enako hitrost (C_{max}) absorpcije, na podlagi predpostavke, da ob enakih plazemskih koncentracijskih profilih dosegamo enak terapijski efekt. (12)

Bioekvivalenčno statistiko smo računali s testom ANOVA.

Statistični model za računanje bioekvivalence je

$$Y_{ijk} = \mu + G_k + S_{ik} + P_j + F_{(j,k)} + C_{(j-1,k)} + e_{ijk} \quad (\text{Enačba 13})$$

Pri čemer je: Y_{ijk} farmakokinetični parameter pri osebkcu i , v sekvenci k in periodi j ; μ celokupna aritmetična sredina; G_k vpliv sekvence k , S_{ik} vpliv osebkca i v sekvenci k (interindividualna variabilnost), P_j vpliv periode, $F_{(j,k)}$ vpliv zdravila v periodi j in sekvenci k , $C_{(j-1,k)}$ vpliv »carryover« učinka prvega reda za zdravilo v sekvenci k s periodo $j-1$ in e_{ijk} nepojasnjena varianca (intraindividualna variabilnost).

Primerjali smo vrednosti AUC in Cmax, dokazujemo enakost dveh formulacij. Izračunane AUC in Cmax smo logaritemsko transformirali v lnAUC in lnCmax.

Bioekvivalenca je dokazana, ko zavrnamo ničelno hipotezo H_0 in potrdimo alternativno hipotezo H_1 :

$$H_0: \mu_{\ln T} - \mu_{\ln R} \leq \ln 0,8 \text{ ali } \mu_{\ln T} - \mu_{\ln R} \geq \ln 1,25$$

$$H_1: \ln 0,8 < \mu_{\ln T} - \mu_{\ln R} < \ln 1,25$$

Pri čemer sta $\mu_{\ln T}$ in $\mu_{\ln R}$ aritmetični sredini za testno in referenčno formulacijo na logaritemski skali.

Pri 90% intervalu zaupanja za razmerje aritmetičnih sredin ($\alpha = 5\%$) dobimo kriterij:

$$(\mu_{\ln T} - \mu_{\ln R}) - t_{0,90n_1+n_2-2} \sqrt{\frac{\sigma_e^2}{2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)} > \ln 0,8 \quad (\text{Enačba 14})$$

$$(\mu_{\ln T} - \mu_{\ln R}) + t_{0,90n_1+n_2-2} \sqrt{\frac{\sigma_e^2}{2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)} < \ln 1,25 \quad (\text{Enačba 15})$$

Da potrdimo bioekvivalenco dveh formulacij mora biti torej izračunani 90% interval zaupanja za razmerje parametrov Cmax in AUC med testno in referenčno formulacijo v celoti v bioekvivalenčnem intervalu 80-125%.

Za preizkus naše metode smo se odločili primerjati vse naše hipotetične formulacije med sabo. Naš rezultat je razmerje uspešnih in neuspešnih bioekvivalenčnih študij, izračunano na podlagi 1000- krat ponovljenega eksperimenta za vsak primerjani par formulacij pri določenem številu oseb. Rezultat je verjetnost za uspešnost bioekvivalenčne študije.

21 različnih primerjav testno-referenčno zdravilo smo ponovili pri različnih velikostih vzorcev, $n=12, 24$ in 36 oseb, pri povprečnem času prehoda skozi želodec $t=0,1$ ura.

Za namen ugotavljanja smiselnosti dodajanja intraindividualne variabilnosti smo računali bioekvivalenčno statistiko s podatki brez dodane intraindividualne variabilnosti, z dodano intraindividualno variabilnostjo in z dodano dvakratno vrednostjo intraindividualne variabilnosti za vseh 21 različnih bioekvivalenčnih raziskav pri vseh treh velikosti vzorcev.

Nato smo eksperiment ponovili še z tremi različnimi časi prehoda skozi želodec, $t=0,1$, $0,25$ in $0,5$ ure. S tem smo ocenjevali vpliv različne hitrosti praznjenja želodca na plazemske profile pri vzorcu $N=24$ oseb in dodani intraindividualni variabilnosti.

Vse skupaj smo izvedli simulacije 231 000 bioekvivalenčnih študij.

4 REZULTATI in RAZPRAVA

4.1 FIZIOLOŠKI FARMAKOKINETIČNI MODEL

Spodaj so navedeni podatki, vključeni v izgradnjo modela v programu GastroPlus™ in validacija modela.

4.1.1. Fizikalno kemijske lastnosti acetilsalicilne kisline

Fizikalno kemijske lastnosti ASA, neobložene tablete, 500 mg s takojšnjim sproščanjem, ki so opisane v spodnjih tabelah (Tabele 1-3) so vključene v fiziološko farmakokinetični model izdelan v programu Gastroplus™.

Tabela 1: Lastnosti farmacevtskega produkta

Parameter	Vrednost	Vir
Molekulska masa (g/mol)	180,157	(19)
Molekulska formula	C ₉ H ₈ O ₄	(19)
log P	1,18	(19)
Doza (mg)	500	(19)
Volumen tekočine ob zaužitju zdravila (mL)	200	Privzeto Gastroplus
Topnost (ph=3,5) (mg/ml) T=37	5,004	(19)
Difuzijski koeficient	1,0095	izračunano GastroPlus
Gostota delcev (g/mL)	1,2	Privzeto Gastroplus
Velikost delcev (μm)	1000	Privzeto Gastroplus
Efektivna permeabilnost	človek	Privzeto Gastroplus
Peff (cm/s) 10 ^{*-4}	4,143	Caco-2 podatki preračunani na človeka z modelom vgrajenim v GastroPlus™
Caco -2	3,067 * 10 ⁻⁵	(19)

Tabela 2: Topnost acetilsalicilne kisline v odvisnosti od pH (15)

pH	topnost (mg/ml)
1	4,70
3,5	5,00
4,5	6,62
6,8	7,64

Podatki o topnosti sledijo iz literature. Voelker in sodelavci so primerjali raztapljanje in farmakokinetiko navadnega (neobložena tableta, 500mg) in mikroniziranega Aspirina. Za izgradnjo modela smo uporabili podatke za neobloženo tableto Aspirina. Testi raztapljanja so bili izvedeni po postopku opisanemu v ameriški farmakopeji (USP). Poleg predpisanega vzorčenja pri 30 minutah so se odločili za dodatne vzorce pri 1, 3, 6 in 15 minutah. Rezultati, uporabljeni pri našem modelu so navedeni v Tabeli 3 (20).

Tabela 3: Topnost neobložene tablete aspirina, 500 mg pri pH =6,6 (20)

t (h)	% raztopljene učinkovine
0,0167	6,1
0,05	16,5
0,1	36,4
0,25	82,8
0,5	101,2

4.1.2 Parametri prostorskega modela

Optimizacijski modul je dodatna funkcija GastroPlusTM, ki nam omogoča optimizacijo prostorskega modela, da se prilega opazovanim vrednostim. Modul optimizira enega ali več parametrov modela, ki jih določimo sami, tako da dobimo čimboljše ujemanje plazemskega profila ali pa parametrov; C_{max}, T_{max}, AUC, F_a, F_b z opaženimi vrednostmi (F_a in F_b označujeta delež absorbirane oziroma neabsorbirane) učinkovine. Z optimizacijskim modulom smo v našem primeru prilagodili ASF – »absorption scale factors«.

Prilagodili smo jih glede na plazemski profil opazovane formulacije acetilsalicilne kisline, ki sledi iz literature. Parametri prostorov gastrointestinalnega traka modela so opisani v Sliki 3.

Compartment Data												
Compartment	Peff	ASF	pH	Transit Time (h)	Volume (mL)	Length (cm)	Radius (cm)	SEF	Bile Salt (mM)	Pore R (Å)	Poros/L (cm ⁻¹)	Comp. Type
Stomach	0	0.0	1.30	0.10	46.56	28.29	9.67	1.000	0.0	2.200	2.580	Stomach
Duodenum	0	5972.2	6.00	0.26	41.56	14.13	1.53	4.235	2.800	10.41	48.64	Intestinal
Jejunum 1	0	5878.4	6.20	0.93	154.2	58.40	1.45	3.949	2.330	9.640	38.90	Intestinal
Jejunum 2	0	5832.3	6.40	0.74	122.3	58.40	1.29	3.489	2.030	8.400	26.09	Intestinal
Ileum 1	0	5766.2	6.60	0.58	94.29	58.40	1.13	3.029	1.410	7.160	16.46	Intestinal
Ileum 2	0	5654.8	6.90	0.42	70.53	58.40	0.98	2.569	1.160	5.920	9.540	Intestinal
Ileum 3	0	5522.7	7.40	0.29	49.83	58.40	0.82	2.109	0.140	4.680	4.896	Intestinal
Caecum	0	2.246	6.40	4.19	47.49	13.19	3.39	1.790	0.0	3.920	2.915	Colon
Asc Colon	0	4.375	6.80	12.57	50.33	27.65	2.41	2.480	0.0	3.500	3.220	Colon

Slika 3: Pogoji v različnih delih prebavnega traka (slika iz programa Gastroplus™)

Čas prehoda skozi želodec (ang. Transit time) označuje povprečen čas prehoda. V želodcu smo ta čas nastavili na 0,10 ure, tako da smo maksimirali občutljivost modela na velikost delcev. Ker smo želeli raziskati tudi vpliv prehoda skozi želodec, smo izvajali simulacije študij tudi pri povprečnem času prehoda 0,25 ure in 0,5 ur.

Z Optimizacijskim modulom smo se odločili za uporabo Opt LogD Modela SA/V 6.1. Absorpcijski faktorji C1-C4 so optimizirani, tako da čimbolje opisujejo krivuljo plazemskih koncentracij acetilsalicilne kisline. Opazimo lahko, da se večina učinkovine absorbira na začetku tankega črevesa, saj C1 in C2 opisujeta tanko črevo, C3 in C4 pa kolon in cekum. Vrednosti absorpcijskih faktorjev so podane v Tabeli 4.

Tabela 4: Fiziološki parametri modela

ASF model	Opt LogD Model SA/V 6.1	Vir
C1	22,41	Optimizirana vrednost GastroPlus™
C2	1,079	Optimizirana vrednost GastroPlus™
C3	2,123	Optimizirana vrednost GastroPlus™
C4	$6,322 \cdot 10^{-11}$	Optimizirana vrednost GastroPlus™
Qh(L/min)	1,5	Privzeto GastroPlus™
Percent Fluid in SI	40	Privzeto GastroPlus™
Colon	10	Privzeto GastroPlus™

4.1.3 Farmakokinetični parametri modela

Manjkajoče farmakokinetične parametre, očistek in volumen porazdelitve smo pridobili s pomočjo PKPlus modula, ki je dodatni modul GastroPlus™ s katerim lahko prilegamo parametre za eno do triprostorski model iz IV ali peroralnih plazemskih profilov. Odločili smo se za uporabo enoprostorskega modela za nadaljnje simulacije, ker smo dobili najboljše ujemanje po preizkusu različnih modelov z modulom PKPlus. Parametri so podani v Tabeli 5. *FPE jetra* označuje delež učinkovine, ki se presnovi v jetrih preden učinkovina doseže sistemski krvni obtok. *EXP plasma Fup (%)* označuje odstotek učinkovine, ki ni vezan na plazemske proteine.

Tabela 5: Farmakokinetični parametri modela

PK Model	Enoprostorski model	
Telesna teža	70 kg	Privzeto GastroPlus™
FPE jetra (%)	32	(19)
EXP plasma Fup (%)	66	(19)
CL (L/h)	56,87	PkPlus
Vc (L/kg)	0,386	PkPlus
T1/2 (h)	0,33	Izračunano Gastroplus™

Zanesljivo bi model bolje opisoval obnašanje zdravila, če bi imeli na voljo vse klinične podatke, kot na primer očistek in volumen porazdelitve. Kljub temu, da se zavedamo omejitev modela, smo se odločili, da model za namen eksperimentiranja z virtualnimi študijami dovolj natančno opisuje obnašanje acetilsalicilne kisline. V nadaljevanju sledi ovrednotenje modela.

4.2 VREDNOTENJE MODELA

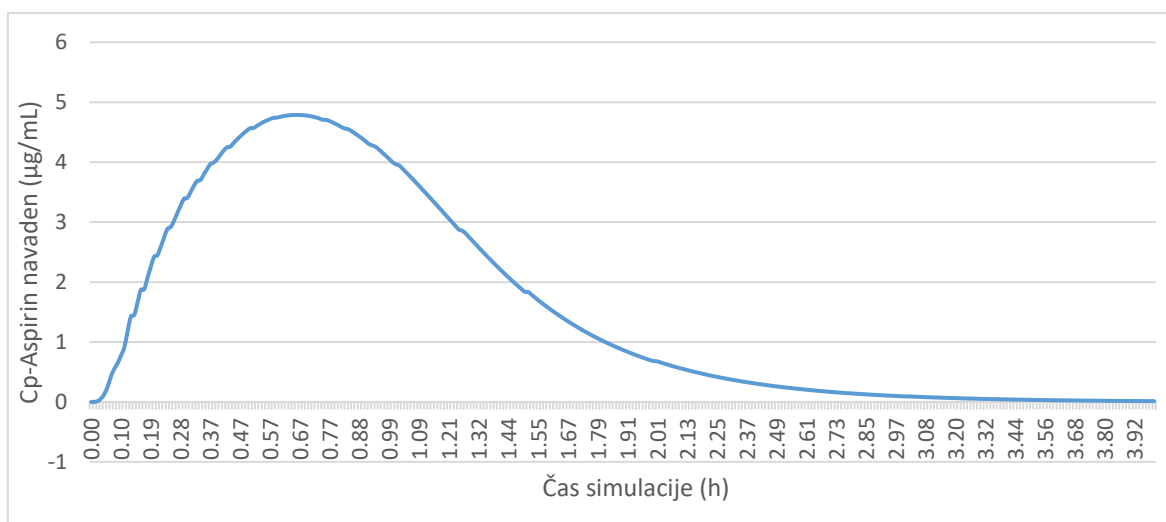
V naslednjem koraku smo naš model ovrednotili in preverili, kako dobro opisuje farmakokinetiko tablete s takojšnjim sproščanjem z vsebnostjo 500 mg acetilsalicilne kisline. Za validacijo smo uporabili podatke iz klinične študije, ki so jo opisali raziskovalci Voelker in sodelavci v članku, iz katerega smo črpali podatke o tableti Aspirina 500 mg s takojšnjim sproščanjem.

Izvedena je bila na 26 prostovoljcih, s povprečno starostjo 33,5 let (SD= 8.58) , povprečno težo 72,4 kg (SD= 13,6), povprečno višino 166,6 cm (SD=10.1) in indeksom telesne teže 25,9 (SD=3.3). Namen študije je bil sicer primerjati farmakokinetiko različnih farmacevtskih oblik, ki vsebujejo acetilsalicilno kislino. V študiji so za tableto aspirina izračunali povprečno vrednost C_{max} 4,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, vrednost AUC_{0-t} pa 6,4 $\mu\text{g h/mL}$, $AUC_{0-\infty}$ 6,5 $\mu\text{g h/mL}$. Naš model napove vrednost C_{max} 4,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, vrednost AUC_{0-t} pa 6,0 $\mu\text{g h/mL}$ in $AUC_{0-\infty}$ 6,0 $\mu\text{g h/mL}$.

Primerjava našega modela in rezultatov klinične študije, ter izračunana napaka (%Pe) so predstavljeni v Tabeli 6.

Tabela 6: Primerjava farmakokinetičnih parametrov klinične študije iz literature in rezultati modela

	Klinična študija (20)	Rezultat modela	% Pe
C_{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	4,4	4,8	8,8
AUC_{0-t} ($\mu\text{g h/mL}$)	6,4	6,0	-6,7
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g h/mL}$)	6,5	6,0	-8,0
t_{max} (h)	0,75	0,67	



Slika 4: Plazemska koncentracija acetilsalicilne kisline v odvisnosti od časa

4.2.1 Simulacija bioekvivalenčne študije

Namen magistrske naloge je simulirati bioekvivalenčne raziskave, zato smo v naslednjem koraku simulacijo ponovili na populaciji 26 zdravih osebkov. Nadgradnja v napovedovanju farmakokinetike je ta, da so parametri modela, ki so navedeni v Prilogi II, variirali znotraj določene KV (konstanta variance je različna za različne parametre), in na podlagi le-te program naključno izračuna 26 različnih plazemskih profilov. V tem koraku nas je tudi zanimalo v kakšnem območju se gibajo naši rezultati, ki so ponazorjeni s KV% za parametre C_{max} in AUC v Tabeli 7. Do največjega razkoraka med vrednostim iz literature in simuliranimi vrednostmi pride pri vrednosti C_{max}, kjer je konstanta variacije precej manjša pri našem modelu kot pri vrednostih iz študije iz literature. Tudi po različnih modifikacijah modela se nam ni uspelo približati tako velikemu razponu vrednosti.

Tabela 7: Primerjava farmakokinetičnih parametrov klinične študije in simulacije klinične študije

Parameter	Simulirana vrednost (26 osebkov)	Klinična študija	% PE	Simulirana vrednost KV %	Literaturna vrednost KV%
C _{max} (µg /mL)	3,90	4,4	11,4	21,1	35
AUC _{0-inf} (µg h/mL)	6,07	6,5	6,55	26,9	24
AUC _{0-t} (µg h/mL)	6,03	6,4	5,86	28,6	24

4.3 HIPOTETIČNE FORMULACIJE

Za potrebe raziskave smo izdelali sedem različnih hipotetičnih formulacij z različnimi profili sproščanja. Velikost delcev učinkovine je parameter, ki smo ga spreminjali, medtem ko vse ostale lastnosti modela ostajajo popolnoma enake za vse modelne formulacije.

Hitrost raztapljanja delcev učinkovine je opisana z Noyes-Whitneyevo enačbo.

$$\frac{dC}{dt} = \frac{k \cdot P}{V} (C_s - C) \quad (\text{Enačba 16})$$

Pri čemer velja: dC/dt je hitrost raztapljanja, k je konstanta hitrosti raztapljanja, P je površina pri kateri raztapljanje poteka, V je volumen, v katerem raztapljanje poteka, C_s je topnost, C je koncentracija raztopljene substance v okolišnji raztopini (6).

Iz enačbe je razvidno, da s spreminjanjem površine delcev lahko vplivamo na hitrost raztapljanja. Manjši kot je polmer delcev učinkovine, več delcev vsebuje tableta, kar predstavlja večjo površino na voljo za raztapljanje, zato pride do hitrejšega raztapljanja.

Profili sproščanja so opisani v Tabeli 8 in grafično prikazani na Sliki 5.

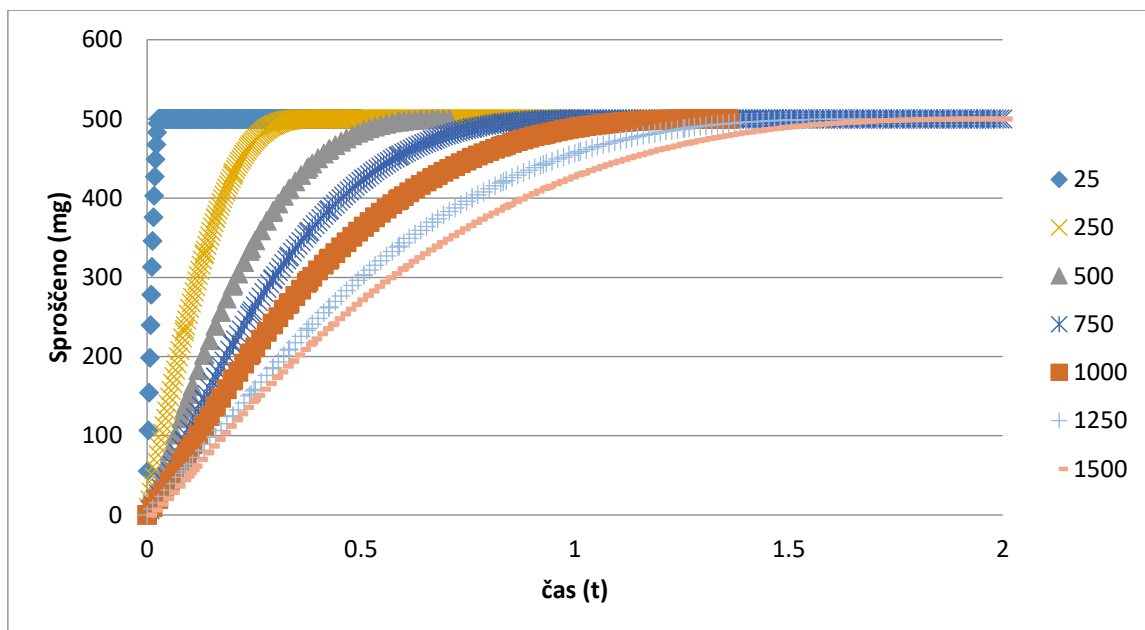
Tabela 8: Čas raztapljanja hipotetičnih formulacij

r delcev (µm)	85% raztopljene (min)
25	0,72
250	11,4
500	21
750	30
1000	39,6
1250	51,18
1500	58,8

Velikost delcev smo spreminjali od 25 µm do 1500 µm. Hipotetičnim formulacijam se raztopi 85% učinkovine v obsegu od manj kot minute (0.72 minute) do skoraj ene ure (58.8 minute) z okvirnim presledkom 10 minut.

Formulacija z velikostjo delcev $r=25$ µm bi hipotetično lahko opisovala tableto z mikroniziranimi delci, medtem ko formulacija z velikostjo delcev $r=1000$ µm ustreza navadni tableti Aspirin in je enaka osnovnemu modelu.

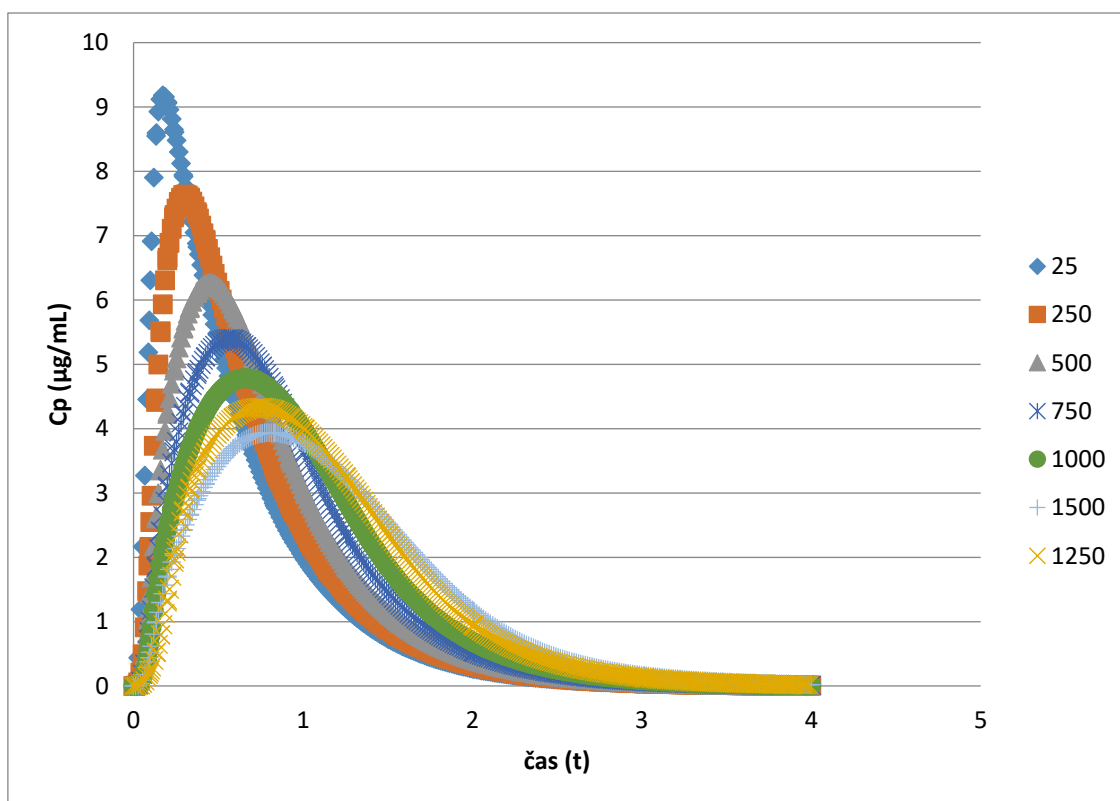
Formulacije so poimenovane po premeru delcev, torej 25, 250, 500, 750, 1000, 1250 in 1500.



Slika 5: Sproščanje učinkovine v odvisnosti od časa

4.3.3 Plazemski profili formulacij

Izdelanim formulacijam smo z modelom napovedali plazemske profile, ki so predstavljeni na Sliki 6.



Slika 6: Plazemske koncentracije v odvisnosti od časa

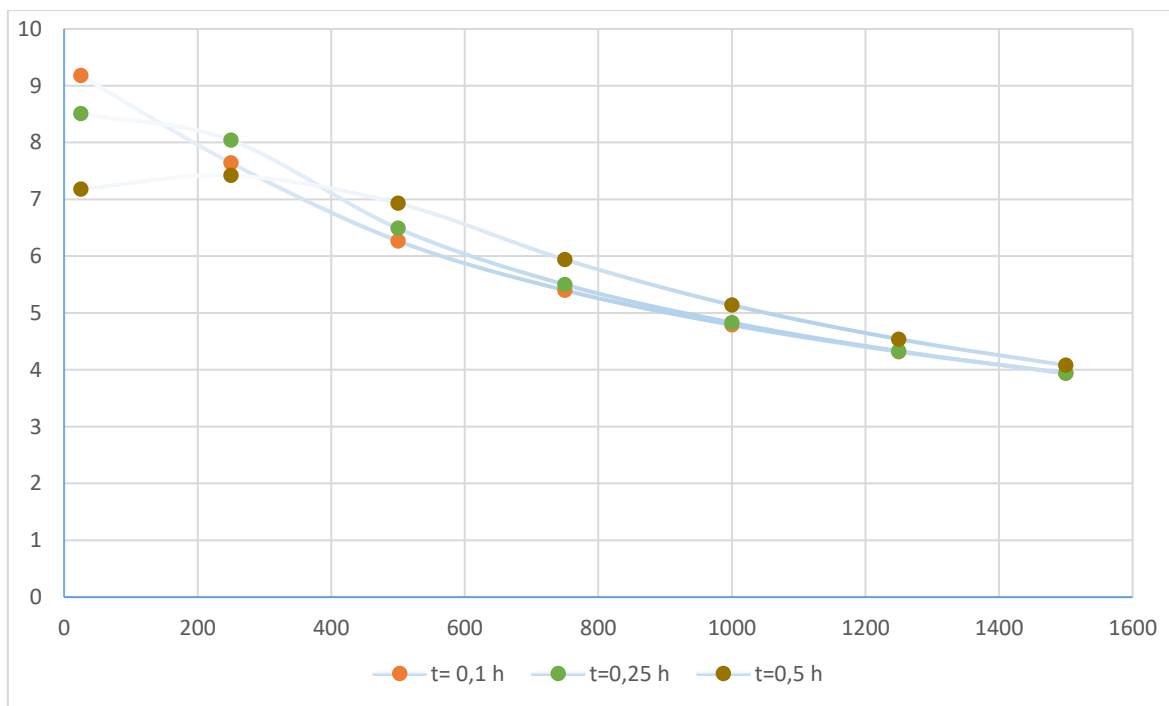
Absorpcija učinkovine je pogojena s permeabilnostjo in topnostjo. Acetilsalicilna kislina spada po biofarmaceutski klasifikaciji zdravil v I. razred, kot dobro topna in dobro permeabilna učinkovina. Kadar je učinkovina dobro permeabilna, lahko na hitrost absorpcije vplivamo s hitrostjo raztapljanja. Tako pride do najhitrejše absorpcije in do največjega C_{max} pri učinkovini z najmanjšimi delci, medtem ko je najpočasnejša absorpcija pri učinkovini z največjimi delci.

Absorpcijo acetilsalicilne kisline smo modelirali tudi pri različnih časih praznjenja želodca. S tem smo ocenjevali vpliv različne hitrosti praznjenja želodca na plazemske profile. Pri simulacijah smo uporabili tri različne čase prehoda skozi želodec, $t = 0,10, 0,25$ in $0,5$ ure. Gre za povprečen čas prehoda zdravila skozi želodec. Čas $t = 0,10$ ure ustreza prehodu raztopine, suspenzije ali kapsule.

Doseženi C_{max} in AUC za različne hipotetične formulacije so predstavljeni v Tabeli 9.

Tabela 9: Vrednosti parametrov C_{max} in AUC kot rezultat modeliranja formulacij z različnimi velikostmi delcev pri različnih povprečnih časih prehoda skozi želodec

r (μm)	Povprečen čas prehoda skozi želodec (t)					
	t=0,1 h		t =0,25 h		t =0,5 h	
	C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	AUC	C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	AUC	C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	AUC
25	9,18	5,98	8,51	5,98	7,18	5,97
250	7,64	5,98	8,04	5,98	7,42	5,97
500	6,27	5,97	6,49	5,97	6,93	5,97
750	5,40	5,97	5,50	5,97	5,94	5,97
1000	4,79	5,97	4,83	5,97	5,14	5,97
1250	4,32	5,97	4,33	5,97	4,54	5,97
1500	3,94	5,97	3,94	5,97	4,08	5,97



Slika 7: Grafični prikaz vrednosti C_{max} za formulacije z različnimi velikosti delcev pri različnih časih prehoda skozi želodec

V naši raziskavi čas praznjenja želodca v veliki meri ne vpliva na obseg absorpcije, zato tudi ni pomembne razlike v vrednosti AUC.

Do večjih nihanj pride pri vrednosti C_{max} , ki je bolj občutljiv parameter pri spreminjanju povprečnega časa prehoda skozi želodec.

Pri formulacijah z manjšimi delci pride do večjih nihanj v vrednosti C_{max} . To sledi iz dejstva, da se pri zelo majhnih delcih vsa učinkovina izredno hitro sprostí in pri hitrem času praznjenja želodca z izjemno hitrostjo doseže centralni krvni obtok. Pri počasnejšem praznjenju želodca se C_{max} zmanjša, saj učinkovina potrebuje dalj časa da doseže tanko črevo, kjer poteka absorpcija v največjem obsegu. Acetilsalicilna kislina je šibka kislina, pH v želodcu pa je nizek (pH v praznem želodcu med 1-3). Tako je hitrost raztapljanja v želodcu nižja kot v črevesnem mediju.

Pri farmacevtskih oblikah z večjimi delci je vpliv na C_{max} manjši in se zmanjšuje z velikostjo delcev. Zanimivo pa je, da daljše zadrževanje v želodcu vpliva nasprotno in se C_{max} pri daljšem času zadrževanja v želodcu celo nekoliko poveča. Pri farmacevtskih

oblikah z večjimi delci je hitrost sproščanja manjša, zato predstavlja praznjenja želodca manjši vpliv, kot pri oblikah z manjšimi delci.

V želodcu imamo na voljo večji volumen za raztapljanje, saj se ob volumnu tekočine želodca (46,5 mL) upošteva dodatno še volumen tekočine pri doziranju, ki znaša 200 mL. Tako lahko pri počasnejšem praznjenju želodca v tanko črevo preide večji delež učinkovine v raztopljeni obliki, ki se nato absorbira v sistemski obtok.

Vmesni kritični primer je formulacija $r=250$, pri kateri se 85% učinkovine sprosti v 11,4 minutah. Pri le-tej pride do najvišjega C_{max} pri času praznjenja želodca $t=0,25$ h (15 minut), saj je v tem času učinkovina že sproščena in preide v krvni obtok hitreje, kot pri $t = 0,1$ h, kjer se učinkovina še raztaplja, medtem ko že preide iz želodca.

Razkorak med vrednostmi se manjša pri formulacijah z večjim premerom delca. Tako je razlika v vrednosti C_{max} pri različnih časih sproščanja iz želodca za formulacijo s premerom delcev 1500 nm najmanjša, saj je v tem primeru vpliv časa zadrževanja v želodcu manjši.

Pri hitrejšem praznjenju želodca opazimo večji vpliv hitrosti raztapljanja na vrednosti C_{max} , saj je razpon med formulacijo z najmanjšimi delci in največjimi večji kot pri počasnejšem praznjenju želodca.

Na podlagi pridobljenih vrednostih C_{max} in AUC smo izračunali razmerja vrednosti AUC in C_{max} med različnimi formulacijami, za lažjo predstavo podobnosti med formulacijami. Te so navedene v spodnjih tabelah, Tabele 10-12 predstavljajo razmerja AUC za različne formulacije.

Tabela 10: Razmerje AUC med različnimi formulacijami pri času prehoda skozi želodec $t = 0,1$ h

r	25	250	500	750	1000	1250	1500
25	100,0						
250	100,0	100,0					
500	100,0	100,0	100,0				
750	100,0	100,0	100,0	100,0			
1000	99,9	99,9	100,0	100,0	100,0		
1250	99,9	99,9	99,9	99,9	100,0	100,0	
1500	99,8	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	100,0

Tabela 11: Razmerje AUC med različnimi formulacijami pri času prehoda skozi želodec $t = 0,25$ h

r	25	250	500	750	1000	1250	1500
25	100,0						
250	100,0	100,0					
500	100,0	100,0	100,0				
750	100,0	100,0	100,0	100,0			
1000	99,9	99,9	100,0	100,0	100,0		
1250	99,9	99,9	99,9	99,9	100,0	100,0	
1500	99,8	99,8	99,9	99,9	99,9	99,9	100,0

Tabela 12: Razmerje AUC med različnimi formulacijami pri času prehoda skozi želodec $t = 0,5$ h

r	25	250	500	750	1000	1250	1500
25	100,0						
250	100,0	100,0					
500	100,0	100,0	100,0				
750	100,0	100,0	100,0	100,0			
1000	99,9	99,9	100,0	100,0	100,0		
1250	99,9	99,9	99,9	99,9	100,0	100,0	
1500	99,8	99,8	99,9	99,9	99,9	99,9	100,0

Kot že sledi iz vrednosti AUC za različne formulacije, je obseg absorpcije podoben za vse, saj gre za BSC 1 učinkovino, ki je dobro topna in dobro permeabilna. Drugače pa je pri razmerjih C_{max} . V spodnjih tabelah 13-15 so razmerja C_{max} nad 80% obarvana zeleno, medtem ko so tista pod 80% obarvana rdeče.

Tabela 13: Razmerje C_{max} med različnimi formulacijami pri času prehoda skozi želodec $t = 0,1$ h

r	25	250	500	750	1000	1250	1500
25	100,0						
250	83,2	100,0					
500	68,2	82,0	100,0				
750	58,8	70,7	86,2	100,0			
1000	52,1	62,6	76,4	88,6	100,0		
1250	47,0	56,5	68,9	79,9	90,2	100,0	
1500	42,9	51,6	62,9	72,9	82,3	91,3	100,0

Tabela 14: Razmerje Cmax med različnimi formulacijami pri času prehoda skozi želodec $t = 0,25 h$

r	25	250	500	750	1000	1250	1500
25	100,0						
250	94,5	100,0					
500	76,3	80,8	100,0				
750	64,7	68,4	84,7	100,0			
1000	56,8	60,1	74,4	87,8	100,0		
1250	50,9	53,9	66,7	78,7	89,7	100,0	
1500	46,3	49,0	60,7	71,7	81,6	91,0	100,0

Tabela 15: Razmerje Cmax med različnimi formulacijami pri času prehoda skozi želodec $t = 0,5 h$

r	25	250	500	750	1000	1250	1500
25	100,0						
250	103,4	100,0					
500	96,6	93,4	100,0				
750	82,8	80,1	85,7	100,0			
1000	71,6	69,2	74,1	86,5	100,0		
1250	63,2	61,1	65,4	76,3	88,3	100,0	
1500	56,8	54,9	58,8	68,6	79,3	89,9	100,0

Razmerja Cmax pokažejo, da so si najbolj podobne farmacevtske oblike z naslednjim redom velikosti delcev: 25 z 250, 250 z 500, 500 z 750 ... Torej farmacevtske oblike s podobno velikostjo delcev pričakovano izkazujejo največjo podobnost. Pri formulacijah katerih razmerje Cmax je manjše od 80% pričakujemo, da ne bo možno prikazati bioekvivalence s simulirano raziskavo.

Na podlagi razmerij parametrov AUC in Cmax v nadaljevanju sledi primerjava uspešnosti simulacij virtualnih bioekvivalenčnih raziskav. Pri zgornjih rezultatih gre zgolj za primerjavo napovedanih plazemskih profilov. V nadaljevanju smo iste modele različnih formulacij uporabili za populacijske simulacije, kjer so upoštevane različne inter- in intraindividualne variabilnosti.

4.4 SIMULACIJA VIRTUALNIH BIOEKVIVALENČNIH RAZISKAV

Študije bioekvivalence smo izvajali na populaciji 1000 oseb, ki smo jih kreirali s programom GastroPlus™ (postopek opisan v poglavju Metode). Iz populacije smo nato naključno jemali vzorce $N = 12, 24, 36$ oseb v 1000 ponovitvah. Rezultati predstavljajo odstotek uspešnosti študij, torej v koliko od 1000 ponovitev je bila potrjena bioekvivalenca. Rezultati so obarvani glede na verjetnost uspešnosti študije; nad 90% zeleno, med 70 – 90% oranžno, pod 70% rdeče. Populacija je bila v vseh ponovitvah študije enaka, parametri se nahajajo v Prilogi II.

Spodnje tabele prikazujejo vse študije, ki so bile simulirane s programom GastroPlus™ in ki smo jim izračunali bioekvivalenčno statistiko ter odstotek uspešnih študij (od 1000 ponovitev). Gre za primerjavo vseh hipotetičnih formulacij pri čemer smo spreminjali število ljudi v vzorcu, čas praznjenja želodca, dodano intraindividualno variabilnost. V tabelah 16-21, ki prikazujejo razmerja uspešnosti bioekvivalenčnih študij ISCV označuje intraindividualno variabilnost, ki je 0, 15 ali 30 odstotna za AUC in 0, 20 ali 40 odstotna za C_{max} , na vzorcih $N = 12, 24$ in 36 oseb. Povprečen čas praznjenja želodca smo nastavili na $t=0,1$ ure, nato pa modificirali na 0,25 in 0,50 ure. Tabele 16 – 22 predstavljajo rezultate vseh simuliranih bioekvivalenčnih raziskav.

Tabela 16: Razmerje uspešnosti BE raziskav simuliranih na vzorcu $N = 12$, brez dodane intraindividualne variabilnosti pri povprečnem času prehoda skozi želodec $t=0,1$ ura.

N=12, brez dodane ISCV			
	AUC	CMAX	SKUPAJ
25×250	100	54,8	54,8
25×500	100	0	0
25×750	100	0	0
25×1000	100	0	0
25×1250	100	0	0
25×1500	100	0	0
250×500	100	44,1	44,1
250×750	100	0	0
250×1000	100	0	0
250×1250	100	0	0
250×1500	100	0	0
500×750	100	100	100
500×1000	100	0	0
500×1250	100	0	0
500×1500	100	0	0
750×1000	100	100	100
750×1250	100	1	1
750×1500	100	0	0
1000×1250	100	100	100
1000×1500	100	51,5	51,5
1250×1500	100	100	100

Tabela 17: Razmerje uspešnosti BE raziskav simuliranih na vzorcu N = 12 oseb, z dodano intraindividualno variabilnostjo pri povprečnem času prehoda skozi želodec t=0,1 ura.

N=12							
	AUC, ISCV 15%	Cmax, ISCV 20%	SKUPAJ		AUC, ISCV 30%	Cmax, ISCV 40%	SKUPAJ
25×250	92,9	11,1	9,8	25×250	18,4	1,3	0,1
25×500	69,1	0	0	25×500	13,7	0,2	0
25×750	93,9	0	0	25×750	16,1	0	0
25×1000	90,5	0	0	25×1000	17,5	0	0
25×1250	87,7	0	0	25×1250	18,9	0	0
25×1500	92	0	0	25×1500	14,8	0	0
250×500	62,3	2,4	2,1	250×500	17	1,4	0,2
250×750	91,3	0,2	0,2	250×750	15,1	0	0
250×1000	91,3	0	0	250×1000	15,8	0,1	0,1
250×1250	92,9	0	0	250×1250	12,3	0	0
250×1500	91,9	0	0	250×1500	18,7	0	0
500×750	76	52,8	38,8	500×750	16,1	1,8	0,3
500×1000	67,9	8,8	6	500×1000	18,6	1,4	0,3
500×1250	89	0	0	500×1250	14,1	0,6	0
500×1500	84,4	0	0	500×1500	18,3	0	0
750×1000	94,1	35,9	33,2	750×1000	15,7	1,6	0,1
750×1250	95	6,5	6,4	750×1250	15,7	0,9	0,3
750×1500	92,7	0,4	0,4	750×1500	17,3	0,3	0
1000×1250	89,6	38,5	34,4	1000×1250	16,3	1,5	0,1
1000×1500	94,6	5,4	5,3	1000×1500	18,7	1,8	0,1
1250×1500	93,4	28,5	26,9	1250×1500	14,2	2,4	0,2

Odstotek uspešnosti je različen za AUC in Cmax, v večini uspešnost študije zavisi od Cmax, kot bi tudi lahko predvidevali iz samih razmerij vrednosti Cmax različnih formulacij. Po dodani intraindividualni variabilnosti, se ponekod uspešnost bioekvivalenčnih raziskav in dokazovanje enakosti Cmax razlikuje, saj lahko da smo dokazali enakost v parametru Cmax pri istemu vzorcu pa se, sicer v redkih primerih, ni ujemal AUC. To je posledica naključno dodane variabilnosti.

Tabela 18: Razmerje uspešnosti BE raziskav simuliranih na vzorcu $N = 24$ oseb, brez dodane intraindividualne variabilnosti pri povprečnem času prehoda skozi želodec $t=0,1$ ura.

N=24, brez dodane ISCV			
	AUC	C _{max}	SKUPAJ
25×250	100	38,8	38,8
25×500	100	0	0
25×750	100	0	0
25×1000	100	0	0
25×1250	100	0	0
25×1500	100	0	0
250×500	100	80,6	80,6
250×750	98,8	0	0
250×1000	100	0	0
250×1250	100	0	0
250×1500	100	0	0
500×750	100	100	100
500×1000	100	0	0
500×1250	100	0	0
500×1500	100	0	0
750×1000	100	100	100
750×1250	100	0,3	0,3
750×1500	100	0	0
1000×1250	100	100	100
1000×1500	100	76,6	76,6
1250×1500	100	100	100

Tabela 19: Razmerje uspešnosti simuliranih BE raziskav na vzorcu $N = 24$, z dodano intraindividualno variabilnostjo pri povprečnem času prehoda skozi želodec $t=0,1$ ura.

N=24							
	AUC, ISCV 15%	Cmax, ISCV 20%	SKUPAJ		AUC, ISCV 30%	Cmax, ISCV 40%	SKUPAJ
25×250	99,6	12,6	12,5	25×250	64,4	8,9	6,7
25×500	92,5	0	0	25×500	63,2	0,1	0,1
25×750	100	0	0	25×750	59,9	0	0
25×1000	99,9	0	0	25×1000	67	0	0
25×1250	99,7	0	0	25×1250	67,8	0	0
25×1500	99,9	0	0	25×1500	59,2	0	0
250×500	91,3	1,8	1,8	250×500	65	4,9	3,8
250×750	100	0	0	250×750	60,3	0,5	0,3
250×1000	99,8	0	0	250×1000	63,1	0	0
250×1250	100	0	0	250×1250	58,1	0	0
250×1500	99,8	0	0	250×1500	66,3	0	0
500×750	99,8	30,3	30,3	500×750	61,6	16,1	9,3
500×1000	95,1	10,1	9,5	500×1000	63,6	1,6	0,7
500×1250	95,2	0	0	500×1250	57,4	0	0
500×1500	95	0	0	500×1500	66,5	0,1	0
750×1000	100	58,6	58,6	750×1000	60,7	12,3	7,6
750×1250	100	7	7	750×1250	61,6	3,4	1,7
750×1500	99,9	0	0	750×1500	61,8	0,4	0,2
1000×1250	100	66,1	66,1	1000×1250	61,6	13,9	8,4
1000×1500	100	5,3	5,3	1000×1500	66	7	5,2
1250×1500	100	50,5	50,5	1250×1500	58,9	15,1	9,2

Tabela 20: Razmerje uspešnosti simuliranih BE raziskav na vzorcu N = 36, brez dodane intraindividualne variabilnosti pri povprečnem času prehoda skozi želodec t=0,1 ura.

N=36, brez dodane ISCV			
	AUC	C _{MAX}	TOTAL
25×250	100	31,6	31,6
25×500	100	0	0
25×750	100	0	0
25×1000	100	0	0
25×1250	100	0	0
25×1500	100	0	0
250×500	100	82,5	82,5
250×750	100	0	0
250×1000	100	0	0
250×1250	100	0	0
250×1500	100	0	0
500×750	100	100	100
500×1000	100	0	0
500×1250	100	0	0
500×1500	100	0	0
750×1000	100	100	100
750×1250	100	0,2	0,2
750×1500	100	0	0
1000×1250	100	100	100
1000×1500	100	71,7	71,7
1250×1500	100	100	100

Tabela 21: Razmerje uspešnosti simuliranih BE raziskav na vzorcu $N = 36$, z dodano intraindividualno variabilnostjo pri povprečnem času prehoda skozi želodec $t=0,1$ ura.

N=36							
	AUC, ISCV 15%	Cmax, ISCV 20%	SKUPAJ		AUC, ISCV 30%	Cmax, ISCV 40%	SKUPAJ
25×250	100	15,2	15,2	25×250	87,2	12	10,6
25×500	98,4	0	0	25×500	82,8	0,1	0,1
25×750	99,9	0	0	25×750	84,7	0	0
25×1000	100	0	0	25×1000	87,9	0	0
25×1250	100	0	0	25×1250	85,1	0	0
25×1500	100	0	0	25×1500	82,7	0	0
250×500	98	1,1	1	250×500	89,6	5,3	4,8
250×750	100	0	0	250×750	83,5	0,7	0,7
250×1000	100	0	0	250×1000	85	0	0
250×1250	100	0	0	250×1250	81,2	0	0
250×1500	100	0	0	250×1500	88,4	0	0
500×750	99,7	92,6	92,3	500×750	82,6	25,8	21,4
500×1000	99,1	10,9	10,8	500×1000	86,1	1,6	1,5
500×1250	99,2	0	0	500×1250	80	0,1	0,1
500×1500	99,4	0	0	500×1500	84,6	0	0
750×1000	100	73,8	73,8	750×1000	83,8	20,9	17,2
750×1250	100	6,6	6,6	750×1250	83,9	3,6	3,2
750×1500	100	0	0	750×1500	83,8	0,2	0,2
1000×1250	100	82,2	82,2	1000×1250	86,8	34,5	30,9
1000×1500	100	5,8	5,8	1000×1500	87,1	9,5	8,4
1250×1500	100	62,2	62,2	1250×1500	80	31,9	25,7

Obseg absorpcije in posledično AUC se za različne formulacije ni pomembno razlikoval, zato nam v veliki meri uspe pokazati bioekvivalenco. Hiter pregled odstotka uspešnosti pri raziskavah bioekvivalence za parameter AUC nam pokaže, da smo s simuliranimi študijami z vsako od 1000 izvedenih dokazali bioekvivalenco brez dodane intraindividualne variabilnosti. Tudi pri dodani intraindividualni variabilnosti KV 15% nam večina študij napove bioekvivalenco, do večjega znižanja razmerja uspešnosti pa pride pri dodani variabilnosti KV 30%. To je posledica širših intervalov zaupanja, ki padejo izven predpisanih meja 80-125%. Pri taki variabilnosti bi potrebovali večje število oseb v študiji za dokazovanje bioekvivalence.

Ob primerjavi rezultatov simulacij bioekvivalenčnih študij z razmerji C_{max} opazimo, da so študije, pri katerih je bilo razmerje pod 80% (Tabela 13-15) med dvema formulacijama po pričakovanjih skoraj vedno neuspešne. Nekatere študije so kljub temu potrdile bioekvivalenco, kar je posledica dodane naključne intra- in interindividualne variabilnosti.

Pri bioekvivalenčnih študijah z dodano variabilnostjo je uspešnost bioekvivalenčnih študij praviloma manjša, saj večja variabilnost vodi do širših intervalov zaupanja, ki zato večkrat presežejo predpisano območje 80-125%.

V nekaterih primerih dosežemo večjo uspešnost študij kot brez dodane variabilnosti, kar je posledica dejstva, da se razmerje C_{max} zaradi večje variabilnosti naključno bolj približa 100%. Na splošno pa je uspešnost študij pri povprečni hitrosti praznjenja želodca $t = 0,1$ ure majhna, saj so taki pogoji zelo diskriminatorni za razlike v hitrosti raztapljanja in so posledično povprečna razmerja C_{max} daleč od 100% kot je pokazano v Tabeli 13.

4.5 OVREDNOTENJE RAZLIČNIH VPLIVOV NA SIMULACIJE

Za boljše razumevanje in ovrednotenje metode smo podrobneje analizirali vpliv hitrosti praznjenja želodca, velikosti vzorca in dodane intraindividualne variabilnosti.

Podrobnejše primerjav sledijo le na bioekvivalenčnih študijah, pri katerih je bilo razmerje C_{max} večje od 80% pri $t = 0,1$ ura, torej 25 in 250, 250 in 500, 500 in 750, 750 in 1000, 1000 in 1250, 1000 in 1500, 1250 in 1500, zaradi lažje primerjave in predstavitve podatkov.

4.5.1 Vpliv hitrosti praznjenja želodca

Bioekvivalenčne študije smo izvajali tudi pri različnih časih praznjenja želodca. Pri simulaciji vpliva praznjenja želodca smo bioekvivalenčne raziskave izvajali na vzorcu 24 oseb, z dodano variabilnostjo KV 15% na parametru AUC in KV 20% na parametru C_{max} . Rezultati uspešnosti simulacij so prikazani v Tabeli 22.

Tabela 22: Razmerje uspešnosti BE raziskav simuliranih na vzorcu $N = 24$, z dodano intraindividualno variabilnostjo pri povprečnem času prehoda skozi želodec $t=0,25$ ur in $0,5$ ur.

N=24, t (prehod skozi želodec) = 0,25 h				N=24, t (prehod skozi želodec) = 0,5 h			
	AUC, ISCV 15%	Cmax, ISCV 20%	SKUPAJ		AUC, ISCV 15%	Cmax, ISCV 20%	SKUPAJ
25×250	99,8	96	95,9	25×250	100	93,3	93,3
25×500	99,8	85,6	85,4	25×500	100	85,6	85,6
25×750	99,9	13,4	13,4	25×750	99,8	14,8	14,8
25×1000	99,9	0,2	0,2	25×1000	99,8	0,2	0,2
25×1250	10	0	0	25×1250	99,9	0	0
25×1500	99,8	0	0	25×1500	100	0	0
250×500	100	80,7	80,7	250×500	99,9	72,1	72,1
250×750	99,9	8	8	250×750	99,9	6,2	6,2
250×1000	100	0	0	250×1000	99,9	0	0
250×1250	99,9	0	0	250×1250	99,9	0	0
250×1500	99,9	0	0	250×1500	100	0	0
500×750	100	36	36	500×750	100	44,3	44,3
500×1000	99,9	1,6	1,6	500×1000	99,7	0,7	0,7
500×1250	99,7	0	0	500×1250	99,6	0	0
500×1500	99,4	0	0	500×1500	99,6	0	0
750×1000	100	57,8	57,8	750×1000	99,9	49,4	49,4
750×1250	99,9	1,3	1,3	750×1250	99,9	4,3	4,2
750×1500	100	0	0	750×1500	99,8	0	0
1000×1250	100	42,2	42,2	1000×1250	99,9	60,6	60,6
1000×1500	99,8	4,1	4,1	1000×1500	99,8	9,7	9,7
1250×1500	100	54,1	54,1	1250×1500	100	63,8	63,8

Kot je razvidno iz Tabele 34, se pri vrednostih Cmax odstotek uspešnosti raziskav precej spreminja, vpliv povprečnega časa praznjenja želodca je večji pri manjših delcih, kjer uspešnost sunkovito naraste s povečanjem časa prehoda skozi želodec. To je tudi konsistentno z razmerji Cmax v Tabelah 13-15. Pri večjih delcih pa čas praznjenja želodca nima večjega vpliva na uspešnost raziskav.

Tabela 23: Primerjava odstotka uspešnosti BE raziskav pri različnih povprečnih časih prehoda skozi želodec za parameter Cmax

N=24	25×250	250×500	500×750	750×1000	1000×1250	1000×1500	1250×1500
t = 0.10	12,6	1,8	30,3	58,6	66,1	5,3	50,5
t = 0.25	96	80,7	36	57,8	42,2	4,1	54,1
t = 0.5	93,3	72,1	44,3	49,4	60,6	9,7	63,8

4.5.2 Vpliv števila ljudi

Za parameter AUC je brez dodatne variabilnosti na podatkih (Tabela 35) razmerje uspešnosti pri vseh simuliranih raziskavah bioekvivalence 100%. V tem primeru težko opazujemo vpliv števila oseb v vzorcu na rezultat. Ko pa dodamo variabilnost (Tabeli 36 in 37) se začnejo pojavljati razlike v uspešnosti študij. Uspešnost raziskav upade, najbolj očitno za najmanjši vzorec n=12 oseb, pri raziskavah bioekvivalence za 250x500 in 500x750. Za vzorca n=24 in 36 oseb je uspešnost študij povsod nad 90%. Vpliv vzorca pride do izraza komaj pri dvakratnem ISCV kjer razmerje uspešnosti narašča z večanjem vzorca. Medtem ko pri n=12 oseb ne presežemo niti 20% uspešnosti pa se pri vzorcu n= 36 gibamo med 80-90% uspešnostjo. Tako se nam z večanjem vzorca poveča verjetnost uspešnost študije. Ker je razmerje AUC parametrov praktično enako 100% za vse formulacije, gre tukaj predvsem za posledico širjenja intervalov zaupanja.

Tabela 24: Primerjava odstotka uspešnosti BE raziskav pri različnem N brez dodane intraindividulne variabilnosti za parameter AUC

ISCV brez	25×250	250×500	500×750	750×1000	1000×1250	1000×1500	1250×1500
N=12	100	100	100	100	100	100	100
N=24	100	100	100	100	100	100	100
N=36	100	100	100	100	100	100	100

Tabela 25: Primerjava odstotka uspešnosti BE raziskav pri različnem N z dodano intraindividulno variabilnostjo za parameter AUC

ISCV 15%	25×250	250×500	500×750	750×1000	1000×1250	1000×1500	1250×1500
N=12	92,9	62,3	76	94,1	89,6	94,6	93,4
N=24	99,6	91,3	99,8	100	100	100	100
N=36	100	98	99,7	100	100	100	100

Tabela 26: Primerjava odstotka uspešnosti BE raziskav pri različnem N z dodano dvakratno intraindividulno variabilnostjo za parameter AUC

ISCV 30%	25×250	250×500	500×750	750×1000	1000×1250	1000×1500	1250×1500
N=12	18,4	17	16,1	15,7	16,3	18,7	14,2
N=24	64,4	65	61,6	60,7	61,6	66	58,9
N=36	87,2	89,6	82,6	83,8	86,8	87,1	80

Cmax nam ponuja kompleksnejše rezultate. V Tabeli 38, pri rezultatih brez dodane variabilnosti vidimo, da vzorca N=24 in 36 oseb dajeta podobne rezultate. Pri majhnem številu oseb je uspešnost študij precej naključna, kar kaže na to, da je število oseb premajhno za pravo oceno podobnosti Cmax v raziskavi. Pri večjem številu oseb v vzorcu pa se pričakovano pokaže, da lahko napovemo večjo uspešnost študij pri formulacijah z razmerjem Cmax osnovnega modela bliže 100%.

Iz Tabele 39 je razvidno, da bi ob dodani intraindividualni variabilnosti napovedali potrjeno bioekvivalenco le za študijo 500x 750 pri vzorcu N=36 oseb.

Pri dvojni ISCV pa se podobno kot pri AUC, odstotek uspešnosti študij povečuje z večanjem vzorca (Tabela 40).

Tabela 27: Primerjava odstotka uspešnosti BE raziskav pri različnem N brez dodane intraindividulne variabilnosti za parameter Cmax

ISCV brez	25×250	250×500	500×750	750×1000	1000×1250	1000×1500	1250×1500
N=12	54,8	44,1	100	100	100	100	100
N=24	38,8	80,6	100	100	100	76,6	100
N=36	31,6	82,5	100	100	100	71,7	100

Tabela 28: Primerjava odstotka uspešnosti BE raziskav pri različnem N z dodano intraindividulno variabilnostjo za parameter Cmax

ISCV 20%	25×250	250×500	500×750	750×1000	1000×1250	1000×1500	1250×1500
N=12	11,1	2,4	52,8	35,9	35,9	38,5	28,5
N=24	12,6	1,8	30,3	58,6	66,1	5,3	50,5
N=36	15,2	1,1	92,6	73,8	82,2	5,8	62,2

Tabela 29 Primerjava odstotka uspešnosti BE raziskav pri različnem N z dodano dvakratno intraindividulno variabilnostjo za parameter Cmax

ISCV 40%	25×250	250×500	500×750	750×1000	1000×1250	1000×1500	1250×1500
N=12	1,3	1,4	1,8	1,6	1,6	1,5	2,4
N=24	8,9	4,9	16,1	12,3	13,9	7	15,1
N=36	12	5,3	25,8	20,9	34,5	9,5	31,9

4.5.3 Vpliv dodane intraindividualne variabilnosti

Iz Tabel 41- 43 je razvidno, da je za vrednost AUC uspešnost bioekvivalenčnih študij brez dodane intraindividualne variabilnost v vseh primerih 100%, z dodano variabilnostjo 15% se odstotek uspešnosti nekoliko zmanjša, pri variabilnosti 30% pa so z izjemo vzorca 36 oseb uspešnost strmo pade.

Tabela 30: Primerjava odstotka uspešnosti BE raziskav pri različni dodani intraindividulni variabilnosti pri N=12 za parameter AUC

N=12	25×250	250×500	500×750	750×1000	1000×1250	1000×1500	1250×1500
ISCV brez	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
ISCV 15%	92,9	62,3	76	94,1	89,6	94,6	93,4
ISCV 30%	18,4	17,0	16,1	15,7	16,3	18,7	14,2

Tabela 31: Primerjava odstotka uspešnosti BE raziskav pri različni dodani intraindividulni variabilnosti pri N=24 za parameter AUC

N=24	25×250	250×500	500×750	750×1000	1000×1250	1000×1500	1250×1500
ISCV brez	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
ISCV 15%	99,6	91,3	99,8	100,0	100,0	100,0	100,0
ISCV 30%	64,4	65,0	61,6	60,7	61,6	66,0	58,9

Tabela 32: Primerjava odstotka uspešnosti BE raziskav pri različni dodani intraindividulni variabilnosti pri N=36 za parameter AUC

N=36	25×250	250×500	500×750	750×1000	1000×1250	1000×1500	1250×1500
ISCV brez	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
ISCV 15%	100,0	98,0	99,7	100,0	100,0	100,0	100,0
ISCV 30%	87,2	89,6	82,6	83,8	86,8	87,1	80

V primeru Cmax se dodana variabilnost bolj odraža na rezultatih, kjer vidimo velik preskok v odstotku uspešnosti študij pri vseh velikostih vzorcev (Tabele 44-46).

Brez dodane intraindividualne variabilnosti opazimo nižji odstotek uspešnosti pri bioekvivalenčnih raziskavah 25x250 in 250x500 pri N=12, pri večjih vzorcih pa tudi pri 1000x1500. Kaže se nam razlika v formulaciji, saj so ti te formulacije tudi najmanj

podobne med sabo (tabela 13, razmerja Cmax). Pri vzorcu N=12 in dodani dvojni vrednosti intraindividualne variabilnosti se razlike v odstotku uspešnosti ne poznajo, saj je v tem primeru šum na podatkih prevelik. Opazimo lahko, da se ob večjem vzorcu tudi ob tako velikem dodanem šumu izoblikuje podoben trend kot pri nižji dodani variabilnosti.

Tabela 33: Primerjava odstotka uspešnosti BE raziskav pri različni dodani intraindividualni variabilnosti pri N=12 za parameter Cmax

N=12	25×250	250×500	500×750	750×1000	1000×1250	1000×1500	1250×1500
ISCV brez	54,8	44,1	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
ISCV 20%	11,1	2,4	52,8	35,9	35,9	38,5	28,5
ISCV 40%	1,3	1,4	1,8	1,6	1,6	1,5	2,4

Tabela 34: Primerjava odstotka uspešnosti BE raziskav pri različni dodani intraindividualni variabilnosti pri N=24 za parameter Cmax

N=24	25×250	250×500	500×750	750×1000	1000×1250	1000×1500	1250×1500
ISCV brez	38,8	80,6	100,0	100,0	100,0	76,6	100,0
ISCV 20%	12,6	1,8	30,3	58,6	66,1	5,3	50,5
ISCV 40%	8,9	4,9	16,1	12,3	13,9	7,0	15,1

Tabela 35: Primerjava odstotka uspešnosti BE raziskav pri različni dodani intraindividualni variabilnosti pri N=36 za parameter Cmax

N=36	25×250	250×500	500×750	750×1000	1000×1250	1000×1500	1250×1500
ISCV brez	31,6	82,5	100,0	100,0	100,0	71,7	100,0
ISCV 20%	15,2	1,1	92,6	73,8	82,2	5,8	62,2
ISCV 40%	12,0	5,3	25,8	20,9	34,5	9,5	31,9

4.6 OVREDNOTENJE RAZVITE METODE

Naš fiziološki farmakokinetični model za acetilsalicilno kislino se je dobro ujema s podatki iz objavljene klinične študije. Nekoliko je odstopala le napoved populacijske variabilnosti za parameter C_{max} - za naš namen razvoja metodologije simulacij bioekvivalenčnih raziskav pa to ni bilo ključnega pomena.

Za dobro napovedovanje potrebujemo model, ki sloni na kvalitetnih vhodnih podatkih in dobro poznavanje učinkovine, modela in farmakologije. Slabost fizioloških farmakokinetičnih modelov je, da zahtevajo veliko število vhodnih parametrov, ki jih običajno ne poznamo dobro. Kljub temu pa je navadno možno tudi z omejenim številom znanih parametrov zgraditi smiselne in uporabne modele.

Simulacije bioekvivalenčnih raziskav, ki so do sedaj opisane v literaturi se precej razlikujejo v metodologiji in trenutno ni uveljavljene splošne metode izvajanja simulacij bioekvivalenčnih raziskav. Zato smo na podlagi pregleda literature razvili svojo metodologijo.

Za izboljšanje metode bomo morali v prihodnje bolje razumeti variabilnosti parametrov populacije. Uporabili smo prednastavljene konstante variabilnosti za vse parametre, za prihodnje raziskave pa bi bilo priporočljivo raziskati kateri parametri so dejansko pomembni za populacijske simulacije in kako nastavljati variabilnost parametrov, da se bolje približamo realni populaciji.

Populacijski parametri v programu GastroPlusTM so fiziološki kot tudi vezani na fizikalno kemijske lastnosti učinkovine. V raziskavi smo različne profile, ki smo jih pridobili z spreminjanjem vrednosti le-teh parametrov tretirali kot interindividualno variabilnost, a gre za poenostavitev, saj gre v resnici za mešano variabilnost.

Za izdelavo navzkrižnih študij nam trenutno program GastroPlusTM še ne ponuja prave rešitve, saj smo morali po simulaciji podatke izvoziti in dodatno sami računati parametre C_{max} in AUC, ter dodati naključni šum, ki je služil kot intraindividualna variabilnost. Intraindividualno variabilnost smo dodali na podlagi vrednosti iz literature. Te se precej razlikujejo tudi med različnimi raziskavami, zato je težko določiti, kakšna bi bila najpravilnejša vrednost.

Pri načrtovanju simulacij bioekvivalenčnih študij je zelo pomembna pravilna določitev velikost vzorca in posledično moč študije, kot je možno tudi razbrati iz predstavljenih rezultatov.

Zagotovo izvedba večjega števila študij na naključnih vzorcih in predstavitev rezultatov v obliki odstotka uspešnosti bolje napove bioekvivalenco kot pa zgolj izvedba le ene virtualne študije, kot so simulacije študij načrtovane v nekaterih člankih.

Razvita metodologija bo splošno uporabna tudi za drug primere pri načrtovanju bioekvivalenčnih raziskav in je novo orodje za načrtovanje bioekvivalenčnih študij na drugih učinkovinah in primerih.

Trenutno simulacije še ne morejo nadomestiti kliničnih bioekvivalenčnih raziskav, a vsekakor predstavljajo pomoč pri razvoju zdravil v farmacevtski industriji.

Regulatorne agencije prav tako intenzivno preučujejo uporabo fizioloških farmakokinetičnih modelov in populacijsko simulacijo. Zdi se, da bodo v prihodnosti podobne študije vedno bolj zaželeno kot del regulatorne dokumentacije. Tudi zato si lahko obetamo v prihodnost razširjeno uporabo simulacijskih orodij.

Modeliranje in simulacije nam ob prilagoditvi fizioloških parametrov tudi omogočajo napovedovanje na posebnih populacijah, kot so otroci, nosečnice, starejši. Klinične raziskave navadno potekajo na normalnih, zdravih prostovoljcih. Raziskave, ki bi zajemale posebne skupine, kot tudi različne bolnike velikokrat niso na voljo, ali pa bi bile celo neetične. Populacijsko simuliranje nam omogoča povsem nove razsežnosti odkrivanja delovanja zdravila na organizem.

Lahko si obetamo tudi boljše razumevane obnašanja zdravila v primeru različnih bolezni, nedelovanja organov in ostalih različnih fizioloških posebnosti.

Uporaba pa ni omejena samo na industrijo, saj ima metoda potencial v personalizirani medicini, saj omogoča napovedovanje na podlagi individualiziranih modelov. Ob izpolnitvi modelov in metodologije bo uporaba možna ne samo v farmacevtskem razvoju, ampak tudi v klinične namene.

5 SKLEP

V magistrski nalogi smo razvili računalniški fiziološki farmakokinetični model, ki opisuje farmakokinetiko acetilsalicilne kisline. Kakovost vhodnih podatkov je ključnega pomena pri razvoju fizioloških farmakokinetičnih modelov.

Izdelali smo sedem hipotetičnih formulacij tablete acetilsalicilne kisline s takojšnjim sproščanjem, s spreminjanjem velikosti delcev učinkovine, in s tem dosegli različne profile sproščanja. Velikost delcev nima večjega vpliva na obseg, ima pa zato vpliv na hitrost absorpcije, ki je največja pri formulacijah z najmanjšimi delci učinkovine. Pričakovano so največjo podobnosti in bioekvivalenco izkazale formulacije s podobno velikostjo delcev.

Po preučitvi literature in že opisanih metod simulacij bioekvivalenčnih študij, smo razvili metodo simulacij virtualnih bioekvivalenčnih raziskav s fiziološkimi farmakokinetičnimi modeli. Omogoča oceno vpliva farmacevtske oblike in človeške fiziologije ter njuno povezanost na rezultat bioekvivalenčne študije. Prednost razvite metode je, da smiselno vključuje tako inter- kot intrasubjektivno variabilnosti. Obenem pa z dovolj velikim številom simulacij omogoča statistično relevantno oceno verjetnosti za uspešnost bioekvivalenčnih študij. Izziv predstavlja določitev ključnih parametrov, ki okarakterizirajo populacijo in pravilna variabilnost le-teh.

Računalniške simulacije z uporabo fizioloških farmakokinetičnih modelov so uporabno orodje v razvoju zdravil, s katerimi lahko napovedujemo uspešnost kliničnih bioekvivalenčnih študij in obetajo cenejši in hitrejši razvoj zdravil, ter s tem večjo dostopnost novih farmacevtskih izdelkov.

Bibliografija

1. M, Atanajević-Kunc, J, Drinovec in A, Mrhar. *Modeliranje in simulacija v medicini. Zdravniški Vestnik*, 57-71 (2008).
2. H. M. Jones et al., *Physiologically based pharmacokinetic modeling in drug discovery and development: a pharmaceutical industry perspective. Clin Pharmacol Ther* 97, 247-262 (2015).
3. X. Zhang, R. A. Lionberger, B. M. Davit, L. X. Yu, *Utility of physiologically based absorption modeling in implementing Quality by Design in drug development. AAPS J* 13, 59-71 (2011).
4. Jiang W. *The role of predictive biopharmaceutical modeling and simulation in drug development and regulatory evaluation. International Journal of pharmaceutics* 418. 151-160 (2011).
5. H. M. Jones et al., *Application of PBPK modelling in drug discovery and development at Pfizer. Xenobiotica* 42, 94-106 (2012).
6. Bogataj M. *Biofarmacija s farmakokinetiko učbenik. Fakulteta za farmacijo*, 2008.
7. L. X. Yu, G. L. Amidon, *A compartmental absorption and transit model for estimating oral drug absorption. Int J Pharm* 186, 119-125 (1999).
8. Huang W., Lee L. S., Yu X. L. *Mechanistic approaches to Predicting Oral Drug Absorption. The AAPS Journal*, 11(2):217-24 (2009).
9. *Gastroplus™: Better decision through better science. Manual: Simulations Plus Inc.* (2013).
10. A, Mrhar. *Zakaj so bistveno podobna zdravila med seboj zamenljiva? Zdravniški Vestnik* 72, 345-6 (2003).
11. European Medicines Agency. *Scientific guideline - Investigation of bioequivalence..* [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000370.jsp]
12. S. Rani, A. Pargal, *Bioequivalence: An overview of statistical concepts. Indian Pharmaceucial Journal* 36, 209-216 (2004).

13. R.A. Lionberger, X Zhang, *Modeling and Simulation of Biopharmaceutical Performance. Clinical Pharmacology & Therapeutics* 95, 480-482 (2014).
14. Yu X. Lawrence, Li V. Bing. *FDA Bioequivalence Standards*, AAPS, 2014.
15. J. R. Crison et al., *Biowaiver approach for biopharmaceutics classification system class 3 compound metformin hydrochloride using in silico modeling. J Pharm Sci* 101, 1773-1782 (2012)
16. A. H. Babiskin, X. Zhang, *Application of Physiologically Based Absorption Modeling for Amphetamine Salts Drug Products in Generic Drug Evaluation. J Pharm Sci* 104, 3170-3182 (2015).
17. *Simulations Plus Inc, White Paper: Applying GastroPlus™ for Extensions of Biowaivers for BCS Class II Compounds, 2015. [http://www.simulations-plus.com/resource-center/?resource-category=journal-articles]*
18. Y. Tsume, G. L. Amidon, *The biowaiver extension for BCS class III drugs: the effect of dissolution rate on the bioequivalence of BCS class III immediate-release drugs predicted by computer simulation. Mol Pharm* 7, 1235-1243 (2010).
19. Dressman BJ, Nair A, Abrahamsson B, Berendos MD, Groot WD, Kopp S, Langguth P, Polli EJ, Shah PV, Zimmer M. *Biowaiver monograph for immediate-release solid oral dosage forms: acetylsalicylic acid. Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2012.
20. M. Voelker, M. Hammer, *Dissolution and pharmacokinetics of a novel micronized aspirin formulation. Inflammopharmacology* 20, 225-231 (2012).
21. *The R Project for Statistical Computing [https://www.r-project.org/about.html. https://www.r-project.org/about.html].*
22. *Bear v2.8.1: the data analysis tool for average bioequivalence (ABE) and bioavailability (BA) [http://pkpd.kmu.edu.tw/bear/. http://pkpd.kmu.edu.tw/bear/].*
23. Krese A, Mrhar A, Bogataj M. *Vpliv motilitete želodca na prehod farmacevtskih oblik. Farmaceutski Vestnik* 57, 242-247 (2015).

Priloga I: R+ KODA

```
lme.li<-function(dataset,rep)
{
lme.auc=lme(-lnAUC~Treatment,data=dataset,random=~1|Subject)
lme.cmax=lme(-lnCMAX~Treatment,data=dataset,random=~1|Subject)
#lme.cmin=lme(-lnCMIN~Treatment+Period+Sequence,                data=dataset,
random=~1|Subject)
a=intervals(lme.auc, 0.90)
aa=as.matrix(a$fixed)
result.auc=as.matrix(aa[2,])
b=intervals(lme.cmax, 0.90)
bb=as.matrix(b$fixed)
result.cmax=as.matrix(bb[2,])
#c=intervals(lme.cmin, 0.90)
#cc=as.matrix(c$fixed)
#result.cmin=as.matrix(cc[2,])
return(c(rep,result.auc,result.cmax))
}
indy.ANOVA<-function(dataset,nREP)
{
m=matrix(c(rep(1,7*nREP)), nrow=nREP, ncol=7, byrow=TRUE,
dimnames=list(c(1:nREP),c("REP","lower_90_AUC","point.est.AUC","upper_90_AUC",
"lower_90_CMAX","point.est.CMAX","upper_90_CMAX")))
for(i in 1:nREP)
```

```
{  
  m[i,]=lme.li(subset(dataset, REP==i), rep=i)  
}  
exp.m=exp(m)  
exp=data.frame(exp.m)  
result=data.frame(m)  
return(exp)  
}
```

Priloga II: POPULACIJSKI PARAMETRI

Subject Number??	Base line	Distribution	CV% - requested ??	Lower Limit	Upper Limit	Mean - produced
Dose-Aspirin navaden	500	Log-Normal	3	457.571	546.364	499.09
Peff-Aspirin navaden	4.14297	Log-Normal	30	1.88574	9.10211	4.35144
PartShape-Aspirin navaden	1	Log-Normal	10	0.75131	1.331	0.99674
RadPart-Aspirin navaden	1000	Log-Normal	10	751.315	1331	1010.56
RadPrecip-Aspirin navaden	1	Log-Normal	10	0.75131	1.331	1.01153
Tprecip-Aspirin navaden	900	Log-Normal	10	676.183	1197.9	899.634
RefSol-Aspirin navaden	5.004	Log-Normal	10	3.75958	6.66032	4.95232
FuEnt-Aspirin navaden	1	Log-Normal	10	0.75131	1.331	1.00508
OralTTime-Aspirin navaden	0.25	Log-Normal	10	0.18783	0.33275	0.25074
Oral Cavity ASF Aspirin navaden	1	Log-Normal	10	0.75131	1.331	1.00041
Duodenum ASF Aspirin navaden	2.84725	Log-Normal	10	2.13918	3.78968	2.81872
Jejunum 1 ASF Aspirin navaden	2.78035	Log-Normal	10	2.08892	3.70064	2.75529
Jejunum 2 ASF	2.73	Log-	10	2.05	3.64	2.692

Aspirin navaden	845	Normal		744	488	63
Ileum 1 ASF	2.68	Log-	10	2.02	3.58	2.606
Aspirin navaden	994	Normal		099	031	47
Ileum 2 ASF	2.61	Log-	10	1.96	3.48	2.601
Aspirin navaden	727	Normal		639	358	56
Ileum 3 ASF	2.53	Log-	10	1.90	3.37	2.540
Aspirin navaden	574	Normal		514	507	56
Caecum ASF	0.02	Log-	10	0.01	0.03	0.023
Aspirin navaden	327	Normal		748	097	46
Asc Colon ASF	0.03	Log-	10	0.02	0.04	0.034
Aspirin navaden	44	Normal		585	579	29
OralMucVol	3.5	Log-	10	2.62	4.65	3.553
		Normal		96	85	32
SalProdRate	1	Log-	10	0.75	1.33	1.000
		Normal		131	1	23
FastedVFColon	10	Log-	10	7.51	13.3	9.955
		Normal		315	1	22
FastedVF	40	Log-	10	30.0	53.2	39.95
		Normal		526	4	03
SILen	306.	Log-	10	230.	407.	306.8
	14	Normal		008	472	5
CaecLen	13.1	Log-	10	9.91	17.5	12.97
	926	Normal		18	594	02
CLen	27.6	Log-	10	20.7	36.7	27.51
	477	Normal		721	991	93
StomVol	46.5	Log-	10	34.9	61.9	46.05
	603	Normal		814	718	36
RadSI	1	Log-	10	0.75	1.33	1.014
		Normal		131	1	38
CaecR	3.38	Log-	10	2.54	4.50	3.380
	51	Normal		328	557	43
CRad	2.40	Log-	10	1.80	3.20	2.397

	73	Normal		864	412	82
StTransTime	0.1	Log- Normal	20	0.05 787	0.17 28	0.101 03
SITT	3.21 211	Log- Normal	20	1.85 886	5.55 052	3.222 4
CaecTransT	4.19 075	Log- Normal	20	2.42 52	7.24 162	3.965 5
CTransT	12.5 723	Log- Normal	20	7.27 561	21.7 248	12.52 31
GBDiv	0.75	Log- Normal	10	0.56 349	0.99 825	0.750 86
GB ET	30	Log- Normal	10	22.5 394	39.9 3	30.23 63
EPG	102	Log- Normal	10	76.6 341	135. 762	101.2 84
Oral Cavity SEF	1	Log- Normal	10	0.75 131	1.33 1	0.989 15
Oral Cavity Poros/PoreL	2.58	Log- Normal	10	1.93 839	3.43 398	2.639 85
Oral Cavity Pore Radius	2.2	Log- Normal	10	1.65 289	2.92 82	2.192 48
Oral Cavity pH	7.4	Log- Normal	12	5.26 717	10.3 965	7.296 18
Stomach SEF	1	Log- Normal	10	0.75 131	1.33 1	1.026 17
Stomach Poros/PoreL	2.58	Log- Normal	10	1.93 839	3.43 398	2.616 85
Stomach Pore Radius	2.2	Log- Normal	10	1.65 289	2.92 82	2.185 5
Stomach pH	1.3	Log- Normal	12	0.92 531	1.82 641	1.286 05
Duodenum SEF	4.23	Log-	10	3.18	5.63	4.231

	464	Normal		155	631	64
Duodenum	48.6	Log-	10	36.5	64.7	47.42
Poros/PoreL	4	Normal		44	398	56
Duodenum Pore	10.4	Log-	10	7.82	13.8	10.39
Radius	1	Normal		119	557	34
Duodenum pH	6	Log-	6	5.03	7.14	6.048
		Normal		772	61	93
Duodenum	2.8	Log-	10	2.10	3.72	2.802
BileSalt Conc		Normal		368	68	57
Jejunum 1 SEF	3.94	Log-	10	2.96	5.25	3.948
	9	Normal		694	612	08
Jejunum 1	38.9	Log-	10	29.2	51.7	38.18
Poros/PoreL		Normal		261	759	37
Jejunum 1 Pore	9.64	Log-	10	7.24	12.8	9.624
Radius		Normal		267	308	01
Jejunum 1 pH	6.2	Log-	6	5.20	7.38	6.245
		Normal		564	43	26
Jejunum 1	2.33	Log-	10	1.75	3.10	2.308
BileSalt Conc		Normal		056	123	66
Jejunum 2 SEF	3.48	Log-	10	2.62	4.64	3.483
	9	Normal		134	386	36
Jejunum 2	26.0	Log-	10	19.6	34.7	26.32
Poros/PoreL	9	Normal		018	258	95
Jejunum 2 Pore	8.4	Log-	10	6.31	11.1	8.325
Radius		Normal		104	804	21
Jejunum 2	2.03	Log-	10	1.52	2.70	2.033
BileSalt Conc		Normal		517	193	67
Ileum 1 SEF	3.02	Log-	10	2.27	4.03	3.047
	9	Normal		573	16	72
Ileum 1	16.4	Log-	10	12.3	21.9	16.81
Poros/PoreL	6	Normal		666	083	15
Ileum 1 Pore	7.16	Log-	10	5.37	9.52	7.181

Radius		Normal		941	996	78
Ileum 1 BileSalt Conc	1.41	Log- Normal	10	1.05 935	1.87 671	1.432 22
Ileum 2 SEF	2.56 9	Log- Normal	10	1.93 013	3.41 934	2.563 44
Ileum 2 Poros/PoreL	9.54	Log- Normal	10	7.16 754	12.6 977	9.466 95
Ileum 2 Pore Radius	5.92	Log- Normal	10	4.44 778	7.87 952	5.789 36
Ileum 2 BileSalt Conc	1.16	Log- Normal	10	0.87 153	1.54 396	1.167 06
Ileum 3 SEF	2.10 9	Log- Normal	10	1.58 452	2.80 708	2.117 97
Ileum 3 Poros/PoreL	4.89 6	Log- Normal	10	3.67 844	6.51 658	4.953 58
Ileum 3 Pore Radius	4.68	Log- Normal	10	3.51 615	6.22 908	4.670 51
Ileum 3 BileSalt Conc	0.14	Log- Normal	10	0.10 518	0.18 634	0.141 97
Caecum SEF	1.79	Log- Normal	10	1.34 485	2.38 249	1.819 12
Caecum Poros/PoreL	2.91 5	Log- Normal	10	2.19 008	3.87 987	2.958 18
Caecum Pore Radius	3.92	Log- Normal	10	2.94 515	5.21 752	3.890 65
Caecum pH	6.4	Log- Normal	3	5.85 691	6.99 345	6.368 88
Asc Colon SEF	2.48	Log- Normal	10	1.86 326	3.30 088	2.468 89
Asc Colon Poros/PoreL	3.22	Log- Normal	10	2.41 923	4.28 582	3.161 03
Asc Colon Pore	3.5	Log-	10	2.62	4.65	3.544

Radius		Normal		96	85	58
Asc Colon pH	6.8	Log- Normal	3	6.22 296	7.43 054	6.788 63
Qh	1.5	Log- Normal	30	0.68 275	3.29 55	1.443 57
SubjWt	70	Log- Normal	19	41.5 391	117. 961	74.28 69
Rbp-Aspirin navaden	1	Log- Normal	10	0.75 131	1.33 1	1.008 83
Fpu-Aspirin navaden	66	Log- Normal	10	49.5 868	87.8 46	66.01 14
Vc/Kg-Aspirin navaden	0.38 64	Log- Normal	20	0.22 361	0.66 77	0.383 81
CL/Kg-Aspirin navaden	0.81 236	Log- Normal	40	0.29 605	2.22 912	0.761 36
LiverFPE%- Aspirin navaden	32	Log- Normal	20	18.5 185	55.2 96	32.85 88