



Univerza v Ljubljani

UNIVERZITETNI DOKTORSKI PROGRAM BIOMEDICINA, SMER FARMACIJA

PRIMERJAVA BIOEKVIVALENČNIH SMERNIC MED EMA IN FDA

Seminar pri predmetu
Regulatorni vidiki kliničnih in nekliničnih raziskav

Avtor: Nina Brvar, mag. farm.
Mentor: prof. dr. Aleš Mrhar, mag. farm.

Ljubljana, 19.07.2010

1. Kazalo

1. Kazalo	2
2. Uvod	4
3. Načrt, izvedba in ovrednotenje bioekvivalenčnih (BE) študij	6
3.1. Načrt študije	6
3.1.1. Eksperimentalni načrt študije.....	6
3.1.2. Vrsta raziskave	7
3.1.2.1. En odmerek ali več odmerkov	7
3.1.2.1.1. Farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem	7
3.1.2.1.2. Farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem.....	8
3.1.2.2. Na tešče ali s hrano.....	9
3.1.2.2.1. Farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem	9
3.1.2.2.2. Farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem.....	10
4. Referenčno in testno zdravilo	11
5. Subjekti	13
5.1. Izbira subjektov.....	13
5.2. Število subjektov	14
6. Izvedba študije	14
6.1. Standardizacija.....	14
6.2. Vzorčenje	16
7. Značilnosti, ki jih je potrebno raziskati	18
7.1. Farmakokinetični parametri.....	18
7.2. Prvotna spojina ali metaboliti	20
7.3. Enantiomeri	21
7.4. Endogene snovi	22
7.5. Zdravila, katerih učinkovine so kompleksne zmesi	22
7.6. Uporaba urinarnih podatkov	23
8. Jakosti, ki jih je potrebno testirati	23
8.1. Farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem.....	23
8.2. Farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem	28
8.2.1. Farmacevtske oblike s podaljšanim sproščanjem	28
8.2.2. Farmacevtske oblike z zakasnjnim sproščanjem	29
9. Bioanalizna metoda	30
10. Ovrednotenje	31
10.1. Parametri, ki jih je potrebno analizirati in sprejemljive meje.....	31
10.2. Statistična analiza.....	32
10.3. Vključitev/izključitev podatkov	34
10.4. Študije v več skupinah	36
10.5. Predstavitev podatkov	37
10.6. Predložitev in vrednotenje podatkov iz več bioekvivalenčnih študij.....	38
11. In vitro testi sproščanja	39
11.1. In vitro testi sproščanja kot dopolnilo bioekvivalenčnim študijam	39
11.1.1. Farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem.....	39
11.1.2. Farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem	40
11.2. In vitro testi sproščanja kot podpora pristopa opustitve bioekvivalenčnih študij za jakosti 40	

11.2.1.	Farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem	40
11.2.2.	Farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem	41
11.3.	Primerjava profilov sproščanja.....	41
12.	Učinkovine z ozkim terapevtskim območjem.....	43
13.	Učinkovine oz. zdravila z visoko variabilnostjo	44
14.	Zahteve za bioekvivalenčne študije za različne farmacevtske oblike.....	45
14.1.	Peroralne raztopine	46
14.2.	Parenteralne raztopine	46
14.3.	Lokalno delujoča zdravila za lokalno uporabo	48
14.4.	Suspenzije	49
14.5.	Plini	49
14.6.	Ne-peroralne farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem s sistemskim delovanjem.....	49
14.7.	Oralne farmacevtske oblike	49
14.7.1.	Orodispersibilne tablete (ODT)	49
14.7.2.	Bukalne in sublingulane farmacevtske oblike ter žvečljive tablete.....	50
14.8.	Sistemi za transdermalno dostavo učinkovin	50
14.9.	Farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem za intramuskularno ali subkutano aplikacijo	51
14.10.	Zdravila s fiksnimi kombinacijami učinkovin	51
15.	Opustitev bioekvivalenčne študije osnovana na BCS.....	52
15.1.	Učinkovina	53
15.1.1.	Topnost	53
15.1.2.	Permeabilnost oz. absorpcija	54
15.2.	Formulacija.....	55
15.2.1.	In vitro sproščanje	55
15.2.1.1.	Določanje lastnosti in vitro sproščanja	55
15.2.1.2.	Vrednotenje rezultatov <i>in vitro</i> sproščanja.....	56
15.2.2.	Pomožne snovi.....	56
15.3.	Zdravila, ki so fiksne kombinacije odmerkov	57
15.4.	Predzdravila	57
16.	Viri	58

2. Uvod

Bioekvivalenca je definirana kot odsotnost signifikantne razlike v hitrosti in obsegu absorpcije po aplikaciji enakega molarnega odmerka dveh zdravil, ki sta bodisi farmacevtska ekvivalenta ali farmacevtska alternativa (1, 6).

Za ovrednotenje hitrosti in obsega absorpcije v bioekvivalenčnih študijah se običajno uporablja plazemska koncentracijska krivulja v odvisnosti od časa. Izbrani farmakokinetični parametri in vnaprej določene meje sprejemljivosti omogočajo končno odločitev o bioekvivalenci testnega zdravila. Površina pod koncentracijsko krivuljo v odvisnosti od časa (AUC) odraža obseg absorpcije. Najvišja koncentracija v plazmi (C_{max}) in čas potreben za doseg najvišje plazemske koncentracije (t_{max}) pa sta parametra, ki sta pod vplivom hitrosti absorpcije (1).

Pri vlogah za generična zdravila je koncept bioekvivalence bistven. Namen določitve bioekvivalence je dokaz ekvivalence v biofarmacevtski kakovosti med generičnim zdravilom in referenčnim zdravilom, s čimer se omogoči premostitev predkliničnih in kliničnih študij, povezanih z referenčnim zdravilom (1).

EMA definira generično zdravilo kot zdravilo, ki ima enako kvalitativno in kvantitativno sestavo učinkovin, je v enaki farmacevtski obliki kot referenčno zdravilo in katerega bioekvivalenca z referenčnim zdravilom je bila dokazana z ustreznimi študijami biološke uporabnosti. Različne soli, estri, etri, izomeri, zmesi izomerov, kompleksi ali derivati učinkovine se obravnavajo kot enaka učinkovina, razen če se ne razlikujejo signifikantno glede varnosti in/ali učinkovitosti. Poleg tega različne peroralne farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem veljajo za enako farmacevtsko obliko (1).

Medtem ko sta po trenutno veljavni definiciji EMA dve zdravili lahko bioekvivalentni, če sta farmacevtska ekvivalenta ali farmacevtska alternativa, pa FDA opredeljuje generična zdravila kot tista zdravila, ki vsebujejo enako količino enake učinkovine (učinkovin) v enaki farmacevtski obliki kot referenčno zdravilo. FDA je torej v opredelitvi terapevtske ekvivalence generičnega in inovativnega zdravila, ki je osnova za medsebojno zamenljivost le-teh, strožja (17).

Omenjeni regulatorni agenciji se pogosto razlikujeta tudi v svojih priporočilih za načrtovanje, izvedbo in ovrednotenje bioekvivalenčnih študij, zahtevah za bioekvivalenčne študije za različne farmacevtske oblike, zahtevah za jakosti in odmerke, ki jih je potrebno testirati v bioekvivalenčnih študijah, priporočilih glede *in vitro* testov sproščanja, uporabljenih bodisi kot dopolnilo bioekvivalenčnim študijam ali kot podpora v primeru opustitve bioekvivalenčne študije, možnostih uporabe *in vitro* študij namesto *in vivo* študij itd. Podobnosti in razlike v priporočilih EMA in FDA na področju bioekvivalenčnih študij so podrobneje obravnavane v nadaljevanju seminarja. Smernice, uporabljene pri primerjavi med obema regulatornima agencijama pa so predstavljene v spodnji preglednici.

Preglednica 1. V seminarski nalogi obravnavane smernice EMA in FDA na področju bioekvivalence.

	Naslov smernice	Datum objave	Vir
EMA	Guideline on the Investigation of Bioequivalence CPMP/QWP/EWP/1401/98 Rev. 1	januar 2010	1
	Note for Guidance on Modified Release Oral and Transdermal Dosage Forms: Section II (Pharmacokinetic and Clinical Evaluation) CPMP/EWP/280/96 Corr *	julij 1999	2
	Questions & Answers: Positions on specific questions addressed to the EWP therapeutic subgroup on Pharmacokinetics EMA/618604/2008 Rev. 1	julij 2009	3
	Guideline on Clinical Development of Fixed Combination Medicinal Products CHMP/EWP/240/95 Rev. 1	februar 2009	4
FDA	Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products – General Considerations	marec 2003	6
	Guidance for Industry: Food-Effect Bioavailability and Fed Bioequivalence Studies	december 2002	7
	Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System	avgust 2001	8
	Guidance for Industry: Statistical Approaches to Establishing Bioequivalence	januar 2001	9
	Guidance for Industry: Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation, and Application of In Vitro/In Vivo Correlations	september 1997	10
	Guidance for Industry: Submission of Summary Bioequivalence Data for ANDAs	april 2009	11

3. Načrt, izvedba in ovrednotenje bioekvivalenčnih (BE) študij

3.1. Načrt študije

3.1.1. Eksperimentalni načrt študije

Priporočila o eksperimentalnem načrtu BE študije se ne razlikujejo bistveno med obravnavanima regulatornima agencijama.

In sicer, kadar primerjamo dve formulaciji, je načrt izbire neponovljeni navzkrižni načrt z dvema periodama in dvema sekvencama. Periodi zdravljenja naj bi bili ločeni z ustrezno dolgo dobo izpiranja, da se zagotovi (1, 6), da so pri vseh subjektih na začetku druge periode koncentracije pod spodnjo mejo bioanalizne kvantifikacije (1). Le-ta naj bi po priporočilih FDA in EMA (6, 1) znašala več kot 5 razpolovnih dob spojin, ki jih merimo.

Tako FDA kot EMA navajata možnost uporabe alternativnih, dobro uveljavljenih načrtov, kot sta vzporedni in ponovljeni načrt.

Prvi se lahko uporabi pri učinkovinah z zelo dolgo biološko razpolovno dobo (1, 6).

Možni razlogi za uporabo ponovljenega načrta pa so naslednji:

- Po EMA BE smernici (1) se lahko le-ta uporabi na primer pri učinkovinah z visoko variabilno farmakokinetiko (glej točko 13);
- FDA BE smernica (6) pa navaja možnost uporabe ponovljenega načrta zaradi številnih prednosti, ki jih le-ta nudi v primerjavi z neponovljenim načrtom, in sicer:
 - omogoča primerjavo intrasubjektne variabilnosti za testno in referenčno formulacijo,
 - daje več informacij o intrinzičnih faktorjih, ki so osnova za obnašanje formulacije in
 - zmanjša število subjektov, udeleženih v BE študijo.

Čeprav FDA navaja nekoliko več razlogov za uporabo ponovljenega načrta BE študije kot EMA, pa pri FDA za razliko od EMA širjenje intervala sprejemljivosti za C_{max} v primeru intrasubjektne variabilnosti referenčne formulacije >30% (glej točko 13) ni sprejemljivo (1, 6).

V študiji s ponovljenim načrtom je pri obeh regulatornih agencijah sprejemljiva uporaba bodisi navzkrižnega načrta s tremi ali štirimi periodami (1, 9). FDA smernica z naslovom »Statistical Approaches to Establishing Bioequivalence« (9) kot ponovljena navzkrižna načrta s tremi in štirimi periodami priporoča spodaj navedena načrta z dvema sekvencama (Preglednici 2 in 3). Za razliko od FDA EMA ne daje posebnih priporočil.

Preglednica 2. S strani FDA priporočen načrt s štirimi periodami, dvema sekvencama in dvema formulacijama (9)

		Perioda			
		1	2	3	4
Sekvenca	1	T	R	T	R
	2	R	T	R	T

Preglednica 3. S strani FDA priporočen načrt s tremi periodami, dvema sekvencama in dvema formulacijama (9).

		Perioda		
		1	2	3
Sekvenca	1	T	R	T
	2	R	T	R

Po priporočilih FDA naj bi se v ponovljeni aplikaciji uporabili enaki seriji testne (T) in referenčne (R) formulacije. Vsako periodo je potrebno ločiti z ustrezno dobo izpiranja.

Da dosežemo enako statistično moč za sklep o BE je za načrt s tremi periodami, dvema sekvencama in dvema formulacijama potrebno večje število subjektov v primerjavi s priporočenim načrtom s štirimi periodami (9).

3.1.2. Vrsta raziskave

3.1.2.1. En odmerek ali več odmerkov

3.1.2.1.1. Farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem

Tako EMA kot tudi FDA pri farmacevtskih oblikah s takojšnjim sproščanjem in sistemskim delovanjem v splošnem priporočata študijo po enkratni aplikaciji odmerka (1, 6). Slednja je namreč bolj občutljiva pri ocenjevanju sproščanja učinkovine iz farmacevtske oblike v sistemsko cirkulacijo kot študija po večkratni aplikaciji odmerka (6).

Študija po večkratni aplikaciji odmerka je lahko sprejemljiva kot alternativa študije po enkratni aplikaciji odmerka v primeru problemov, povezanih z občutljivostjo analizne metode (tj., kadar je koncentracija učinkovine, aktivnega dela učinkovine ali metabolita (metabolitov) v krvi po enkratni aplikaciji odmerka prenizka za dovolj natančno in točno določitev koncentracije z analizno metodo) (1; točka 320.27). Kakorkoli, ker je C_{max} v stacionarnem stanju manj občutljiv na razlike v hitrosti absorpcije kot C_{max} po enkratni aplikaciji odmerka, je slednja po priporočilih EMA sprejemljiva le, kadar vlagatelj ustrezno utemelji, da občutljivosti analizne metode ni mogoče izboljšati in da prvotne spojine ni mogoče zanesljivo izmeriti po enkratni aplikaciji odmerka ob upoštevanju tudi možnosti uporabe supra-terapevtskega odmerka v bioekvivalenčni študiji (glej tudi točko 8.1). EMA je namreč mnenja, da je zaradi nedavnega razvoja bioanalizne metodologije pravzaprav nenavadno, da prvotne spojine ni mogoče izmeriti natančno in točno. Uporaba študije po večkratni aplikaciji odmerka namesto študije po enkratni aplikaciji odmerka zaradi omejene občutljivosti analizne metode bo zato po priporočilih EMA sprejemljiva zgolj v izjemnih primerih.

Izraz občutljivost analizne metode, ki ga zasledimo v obravnavanih smernicah EMA in FDA ter v seminarski nalogi, ne sledi strogi definiciji občutljivosti (t.j. sposobnost analizne metode, da loči že majhne razlike v koncentraciji (ali masi) analita), temveč označuje sposobnost analizne metode za kvantificiranje čim nižjih koncentracij analita (tj. nižja kot je spodnja meja kvantifikacije, bolj občutljiva je analizna metoda in obratno).

FDA kot primer, v katerem je lahko potrebna študija po večkratni aplikaciji odmerka navaja še na primer prekomerno intersubjektivno variabilnost v biološki uporabnosti (320.27).

Po priporočilih EMA je izvedba študije po večkratni namesto enkratni aplikaciji sprejemljiva tudi v določenih primerih, ko študija po enkratni aplikaciji odmerka ne more biti izvedena na zdravih prostovoljcih iz razlogov, povezanih s prenašanjem, študija po enkratni aplikaciji odmerka na pacientih pa ni izvedljiva. V tem primeru je lahko sprejemljiva izvedba študije po večkratni aplikaciji odmerka na pacientih (1).

Po priporočilih EMA se lahko v študijah v stacionarnem stanju doba izpiranja predhodnega zdravljenja prekriva z obdobjem vzpostavljanja stacionarnega stanja v periodi drugega zdravljenja, pod pogojem, da je obdobje vzpostavljanja stacionarnega stanja ustrezno dolgo (vsaj 5 terminalnih razpolovnih dob) (1). FDA pa za omenjene študije zgolj priporoča, da je potrebno izvesti ustrezno odmerjanje in vzorčenje za dokaz dosege stacionarnega stanja (6).

3.1.2.1.2. Farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem

Medtem ko pri farmacevtskih oblikah z zakasnjnim sproščanjem tako EMA kot tudi FDA v splošnem zadostujejo študije po enkratni aplikaciji odmerka (6), pa se stališče omenjenih regulatornih agencij pri farmacevtskih oblikah s podaljšanim sproščanjem razlikuje. In sicer, EMA pri slednjih zahteva izvedbo tako študij po enkratni kot tudi večkratni aplikaciji odmerka, medtem ko FDA zadostujejo študije po enkratni aplikaciji odmerka.

Ker se po mnenju FDA študije po enkratni aplikaciji odmerka bolj občutljive pri obravnavi primarnega vprašanja BE (tj., sproščanje učinkovine iz farmacevtske oblike v sistemsko cirkulacijo), študije po večkratni aplikaciji odmerka niso priporočljive niti v primeru, kjer je prisotna nelinearna farmakokinetika. Slednje velja tako za farmacevtske oblike s podaljšanim sproščanjem kot tudi farmacevtske oblike z zakasnjnim sproščanjem (6).

Nasprotno EMA tudi pri farmacevtskih oblikah z zakasnjnim sproščanjem v primeru odmerka odvisne farmakokinetike ali časovno odvisne farmakokinetike zahteva študije v stacionarnem stanju (3). Časovno odvisna farmakokinetika je na primer značilna za omeprazol (omeprazol namreč auto-inhibira svoj metabolizem). Po evropski regulativi naj bi bila tako za omeprazol bioekvivalenca med generičnim in inovatorjevim zdravilom dokazana po enkratni aplikaciji odmerka v pogojih na tešče in s hrano kot tudi v stacionarnem stanju v pogojih na tešče (3). Nasprotno FDA (16) v primeru omeprazola študije v stacionarnem stanju ne zahteva.

3.1.2.2. Na tešče ali s hrano

3.1.2.2.1. Farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem

Pri farmacevtskih oblikah s takojšnjim sproščanjem EMA priporoča izvedbo BE študije v pogojih na tešče, ker le-ta velja kot najbolj občutljiv za zaznavanje morebitnih razlik med formulacijami. Torej, v primeru, da SmPC referenčnega zdravila priporoča vnos zdravila na prazen želodec ali neodvisno od vnosa hrane, naj bi se bioekvivalenčna študija izvedla v pogojih na tešče. Pri zdravilih, kjer SmPC priporoča vnos referenčnega zdravila le v stanju s hrano, naj bi bila bioekvivalenčna študija v splošnem izvedena v pogojih s hrano (1).

Kakorkoli, za zdravila s posebnimi lastnostmi formulacije (npr. mikroemulzije ali trdne disperzije), pa sta potrebni bioekvivalenčni študiji pod obema pogojema, na tešče in s hrano, razen če naj bi se zdravilo jemalo le v stanju na tešče ali le v stanju s hrano (1).

Medtem ko EMA pri farmacevtskih oblikah s takojšnjim sproščanjem (z izjemo formulacij s posebnimi lastnostmi) zahteva bodisi izvedbo študije na tešče ali s hrano, pa FDA smernica o študijah vpliva hrane in bioekvivalenčnih študijah s hrano (7) poleg BE študije v pogojih na tešče priporoča tudi izvedbo BE študijo v pogojih s hrano za vse p.o. aplicirane farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem z naslednjimi izjemami:

- Ko se obe, testna in referenčna formulacija, hitro raztapljata, imata podobne profile sproščanja in vsebujeta učinkovino z visoko topnostjo in visoko permeabilnostjo (BCS razred I). Pomemben vpliv hrane je namreč po mnenju FDA v tem primeru malo verjeten, saj je absorpcija učinkovin razreda I običajno pH- in mestno-neodvisna in tako neobčutljiva na razlike v sproščanju ali
- Ko navodila za uporabo referenčnega zdravila priporočajo jemanje zdravila le na prazen želodec ali
- Ko navodila za uporabo referenčnega zdravila ne vsebuje kakršnihkoli informacij o vplivu hrane na absorpcijo ali aplikacijo.

Načrt študije

V primerih, ko sta potrebni dve študiji, študija na tešče in študija s hrano, je po priporočilih EMA sprejemljiva izvedba bodisi dveh ločenih bioekvivalenčnih študij z navzkrižnim načrtom z dvema periodama in dvema sekvencama ali ene navzkrižne študije s štirimi periodami (1). FDA zgoraj omenjenega načrta študije s štirimi periodami v svoji smernici o študijah vpliva hrane in bioekvivalenčnih študijah s hrano (7) ne omenja. Kot splošen načrt BE študije s hrano priporoča navzkrižni načrt študije z dvema periodama in dvema sekvencama. Kakorkoli pa le-ta priporoča, da naj bi se v BE študiji na tešče in s hrano uporabila enaka jakost in serija testnega zdravila.

Testni obrok

FDA (7) priporoča, da se BE študija s hrano izvede z obrokom, za katerega so pričakovani največji vplivi na GI fiziologijo in s tem največji vplivi na sistemsko razpoložljivost učinkovine. Kot testni obrok v BE študijah se tako priporoča visoko kaloričen obrok (približno 800 do 1000 kcal) z visoko vsebnostjo maščob (približno 50% celotne kalorične

vsebnosti obroka). Omenjeni testni obrok naj bi vseboval pribl. 150, 250 oz. 500-600 kcal iz proteinov, ogljikovih hidratov oz. maščob. Kot primer testnega obroka FDA navaja dve na maslu pečeni jajci, dve rezini slanine, dve rezini toast kruha z maslom, pribl. 120 g (4 unče) praženega krompirja in pribl. 240 ml (8 unčev) polnomastnega mleka. Zamenjave v tem obroku so možne, dokler obrok zagotavlja podobno vrednost kalorij iz proteinov, ogljikovih hidratov in maščob in ima primerljiv volumen in viskoznost. Kalorična razčlenitev testnega obroka naj bi bila navedena v poročilu študije. V primeru, da je kalorična razčlenitev obroka signifikantno različna od tiste, opisane zgoraj, pa je razliko potrebno znanstveno utemeljiti. Podobno tudi EMA v primeru, da SmPC originatorjevega zdravila ne vsebuje posebnih priporočil glede sestve obroka, priporoča uporabo zgoraj omenjenega visoko kaloričnega obroka z visoko vsebnostjo maščob. Enako kot priporoča FDA naj bi tudi po priporočilih EMA obrok vseboval približno 800 – 1000 kcal, pri čemer naj bi pribl. 50% celotne kalorične vsebnosti obroka predstavjale maščobe. Podobno naj bi obrok vseboval pribl. 150, 250 in 500 - 600 kcal iz proteinov, ogljikovih hidratov in maščob. Sestava obroka naj bi bila opisana glede na vsebnost proteinov, ogljikovih hidratov in maščob (določeno v gramih, kalorijah in relativni kalorični vsebnosti). V primeru pa, da SmPC originatorjevega zdravila vsebuje priporočila o sestavi obroka, EMA priporoča uporabo slednjega.

3.1.2.2.2. Farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem

Ker lahko hrana vpliva na absorpcijo učinkovine aplicirane v gastro-rezistentni farmacevtski obliki, so post-prandialne bioekvivalenčne študije (visoko kaloričen obrok z visoko vsebnostjo maščob) pri teh farmacevtskih oblikah potrebne (2). Regulatorne izkušnje na omeprazolu so celo pokazale, da je najbolj discriminatoreni pogoj za primerjavo biofarmacevtske kakovosti formulacij študija po enkratni aplikaciji odmerka v pogojih s hrano (visoko kaloričen obrok z visoko vsebnostjo maščob) (3).

BE študije farmacevtskih oblik s podaljšanim sproščanjem naj bi bile po EMA bioekvivalenčni smernici za farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem in transdermalne farmacevtske oblike (2) načrtovane tako, da se dokaže, da je vpliv hrane na *in vivo* obnašanje primerljiv za obe formulaciji. Torej sta tudi pri teh farmacevtskih oblikah potrebni obe študiji, študija brez hrane in študija s hrano. Q&A dokument (EMA/618604/2008 Rev. 1) dalje navaja, da kadar SmPC inovatorjevega zdravila vsebuje specifične informacije o aplikaciji zdravila glede na vnos hrane (npr. zdravilo je potrebno jemati le z obrokom ali samo na tešče), so lahko zahteve za dokaz bioekvivalence za pogoj, ki v SmPC ni priporočen, manj stroge od pogoja, priporočenega v SmPC. Kakorkoli se takšne situacije obravnavajo od primera do primera posebej (3).

Regulativa FDA je v tem vidiku strožja. Namreč, za vse p.o. aplicirane farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem naj bi se izvedla BE študija pod obema pogojema, na tešče in s hrano. Možnosti uporabe manj strogih BE zahtev za pogoj, ki v SmPC ni priporočen, ne navaja (7).

Načrt študije

V primerih, kjer je potrebna izvedba obeh BE študij, na tešče in s hrano, smernica EMA (2) priporoča izvedbo dveh navzkrižnih študij z dvema periodama in dvema sekvencama po

enkratnem odmerku v pogojih na tešče in s hrano. Podobno tudi FDA kot splošen načrt BE študije s hrano priporoča navzkrižni načrt študije z dvema periodama in dvema sekvencama. EMAE v Q&A dokumentu (EMA/618604/2008 Rev. 1) (3) kot alternativo za dokaz bioekvivalence med generičnim in referenčnim zdravilom pod obema pogoje, na tešče in s hrano, navaja še izvedbo ene navzkrižne študije s štirimi periodami po enkratnem odmerku. Slednja namreč omogoča primerjavo vpliva hrane med testnim in referenčnim zdravilom, ki pa ni mogoča v primeru dveh navzkrižnih študij z dvema periodama, saj primerjava vpliva hrane med študijami po mnenju EMA ni priporočljiva.

Testni obrok

Podobno kot pri farmacevtskih oblikah s takojšnjim sproščanjem, tudi pri farmacevtskih oblikah s prirejenim sproščanjem obe regulatorni agenciji priporočata uporabo visokokaloričnega obroka z visoko vsebnostjo maščob (2, 7). Ker EMA bioekvivalenčna smernica za farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem in transdermalne farmacevtske oblike (2) ne daje nobenih priporočil glede vrste obroka, se lahko zato uporablja enak obrok z visoko vsebnostjo maščob, kot ga priporoča FDA (glej točko 3.1.2.2.1. Farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem – Testni obrok). Obrok je mogoče prilagoditi lokalnim evropskim razmeram (3). Sestavo visokokaloričnega obroka z visoko vsebnostjo maščob navaja tudi EMA v novi BE smernici za farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem (glej točko 3.1.2.2.1. Farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem – Testni obrok) (1).

Posebni primeri

Q&A dokument (EMA/618604/2008 Rev. 1) (3) nam odgovori tudi na vprašanje: »Ali se lahko zdravilo s prirejenim sproščanjem velja za generično, če nanj hrana nima vpliva, medtem ko na inovatorjevo zdravilo ima?« Odgovor v omenjenem dokumentu je naslednji: Na splošno naj bi bilo generično zdravilo bioekvivalentno zdravilu inovatorja v pogojih na tešče in s hrano. Razlike v vplivu hrane med formulacijama kažejo na razlike med formulacijama, kar je v nasprotju s splošno definicijo generičnega zdravila. Vendar pa je lahko to od primera do primera sprejemljivo pod naslednjimi pogoji:

- da je to klinična utemeljeno,
- da ostane besedilo v SmPC nespremenjeno in
- da ni tveganja za bolnika, ko vzame zdravila bodisi z ali brez hrane.

4. Referenčno in testno zdravilo

Po priporočilih EMA naj bi bilo zdravilo, ki se v bioekvivalenčni študiji uporablja kot referenčno zdravilo, odobreno dovoljenje za promet v EU na podlagi popolnega dosjeja in del globalnega dovoljenja za promet referenčnega zdravila. In sicer naj bi bila izbira referenčnega zdravila utemeljena v Modulu 1.2. (1). V primeru FDA pa je referenčno zdravilo navedeno v Oranžni knjigi (6).

Rezultati kontrole serije testnega in referenčnega zdravila naj bi bili predstavljeni. In sicer, tako EMA kot tudi FDA priporočata, da se vsebnost serije testnega zdravila naj ne bi razlikovala za več kot 5% od vsebnosti serije referenčnega zdravila (1, 6).

EMA dodatno priporoča, da se dokaže, da je bila v bioekvivalenčni študiji izbrana reprezentativna serija referenčnega zdravila glede na sproščanje in vsebnost. Slednje naj bi vlagatelj dokazal s profili sproščanja in analizo vsebnosti več kot ene serije referenčnega zdravila (1).

Podobno EMA priporoča, da naj bi bilo tudi testno zdravilo, uporabljeno v študiji, reprezentativno zdravilo, ki se namerava tržiti. Na primer, v primeru peroralnih trdnih farmacevtskih oblik za sistemsko delovanje navaja EMA naslednja priporočila:

- Testno zdravilo naj bi običajno izviral iz serije, ki predstavlja najmanj 1/10 obsega proizvodnje ali 100.000 enot, kar je večje, če ni drugače določeno.
- Proizvodnja uporabljenih serij naj bi zagotavljala visoko stopnjo zanesljivosti, da bo proces proizvodnje izdelka izvedljiv tudi v industrijskem merilu.
V primeru proizvodnje serije, ki je manjša od 100.000 enot, je potrebna celotna proizvodna serija.
- Za testno serijo, tj. klinično serijo, na kateri je bila dokazana bioekvivalenca, je potrebno določiti lastnosti in specifikacije ključnih značilnosti kakovosti zdravila, kot je sproščanje.
- Vzorci zdravila iz dodatnih pilotnih serij in/ali proizvodnih serij v polnem obsegu, predloženi kot podpora vlogi, naj bi se primerjali z vzorci testne serije, uporabljene v bioekvivalenčni študiji in naj bi izkazovali podobne *in vitro* profile sproščanja pri uporabi ustreznih pogojev testiranja sproščanja (glej točko 11).
Primerjalno testiranje profilov sproščanja je potrebno opraviti na prvih treh proizvodnih serijah.

Če serije iz proizvodnje v polnem obsegu v času vlaganja niso na voljo, naj vlagatelj serije ne bi tržil dokler primerjalno testiranje profilov sproščanja ni končano.

Za ostale farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem za sistemsko delovanje je potrebna podobna utemeljitev reprezentativne narave testne serije (1).

Podobnih priporočil za farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem EMA v svoji smernici, ki pokriva omenjene farmacevtske oblike, ne navaja (2).

Dalje daje EMA priporočila tudi glede pakiranja referenčnega in testnega zdravila. In sicer, naj bi bila oba pakirana individualno za vsakega subjekta in vsako periodo, bodisi pred pošiljanjem na kraj izvedbe študije ali na kraju samem. Pakiranje (vključno z označevanjem) naj bi bilo izvedeno v skladu z dobro proizvodno prakso, vključno s Prilogo 13 k EU smernici za GMP.

Identiteto zdravila naj bi bilo mogoče za vsakega subjekta v vsaki periodi nedvoumno ugotoviti. Pakiranje, označevanje in aplikacija zdravil subjektom naj bi bila zato podrobno dokumentirana. Ta dokumentacija mora vključevati vse previdnostne ukrepe za preprečevanje in odkrivanje potencialnih napak pri aplikaciji (1).

Podobnih priporočil FDA glede zgoraj obravnavanih vprašanj v smernicah FDA, obravnavanih v seminarju, ne najdemo.

Kakorkoli pa FDA navaja priporočila o hranjenju vzorcev testne in referenčne formulacije (in sicer naj bi se le-ti hranili najmanj 5 let) (6), ki jih v novi BE smernici (1) ni več.

5. Subjekti

5.1. Izbira subjektov

Regulatorne agencije se razlikujejo v svojih priporočilih glede izbire subjektov za BE študije (Preglednica 4).

Preglednica 4. Razlike med priporočili EMA in FDA glede izbire subjektov v BE študijah.

	EMA	FDA
zdravi prostovoljci/ pacienti	zdravi prostovoljci*	zdravi prostovoljci*
spol	moški in ženske	moški in ženske**
starost	≥18 let	≥ 18 let**
telesna masa	ITM 18.5 – 30 kg/m ²	/
rasa	/	**
kajenje	po možnosti nekadilci ali zmerni kadilci (<10 cigaret/dan)	/
genotipizacija, fenotipizacija	lahko je dovoljena***	/

* možnost izvedbe BE študije na pacientih

** preferirana izvedba študije na tarčni populaciji

*** varnostni ali farmakokinetični ralogi

Študija naj bi bila normalno izvedena na zdravih prostovoljcih. Kakorkoli, tako EMA kot FDA v nekaterih primerih dopuščata možnost izvedbe študije na pacientih (1, 6, 7). Kot edini možni razlog za izvedbo študije na pacientih regulatorni agenciji navajata skrbi glede varnosti (FDA) (7) oz. stranske učinke učinkovine in farmakološke učinke ter tveganja, ki so za zdrave prostovoljce nesprejemljivi (EMA) (1). V tem primeru naj bi se študija po priporočilih EMA izvedla pod ustreznimi varnostnimi ukrepi in nadzorom (1). FDA pa v primeru izvedbe študije na pacientih, katerim je zdravilo namenjeno, dalje priporoča, da naj bi bili v študijo vključeni pacienti, pri katerih je bolezenski proces stabilen v času trajanja BE študije.

EMA je v večini primerov model *in vivo* zdravih prostovoljcev ustrezen za detekcijo razlik med formulacijami in nadaljno ekstrapolacijo rezultatov na populacije, za katere je referenčno zdravilo odobreno (starejši, otroci, bolniki z renalno ali jetrno okvaro,...). Kot razlog za izvedbo študij na zdravih prostovoljcih navaja zmanjšanje variabilnosti, ki ni povezana z razlikami med formulacijami. Iz enakega razloga naj bi bile v študijah z vzporednim načrtom zdravljene skupine primerljive v vseh znanih prognostičnih spremenljivkah, ki vplivajo na farmakokinetiko učinkovine (npr. starost, telesna masa, spol, etični izvor, kajenje, slabi/dober presnavljalec), kar je predpogoj za veljavnost rezultatov študije (1). Medtem ko je EMA bolj zaskrbljena glede vprašanj variabilnosti, pa FDA priporoča izvedbo študij na subjektih, ki predstavljajo splošno populacijo, upoštevajoč starost, spol in raso. Torej, če je zdravilo namenjeno uporabi pri obeh spolih, priporočajo vključitev podobnih deležev moških in žensk. Če se učinkovina uporablja pretežno na

starejših, podobno priporočajo, da se v študijo vključi čim več subjektov starih 60 let ali več (6).

EMA za razliko od FDA dodaja še nekaj vključitvenih/izključitvenih kriterijev, ki naj bi bili jasno navedeni v protokolu. Medtem ko FDA ne omejuje telesne mase prostovoljcev, naj bila telesna masa prostovoljcev po priporočilih EMA v območju ITM 18.5 – 30 kg/m². Dalje naj bi bili subjekti po možnosti nekadilci, brez zlorabe alkohola ali drog v preteklosti. V primeru pa, da so v študijo vključeni zmerni kadilci (manj kot 10 cigaret dnevno), je potrebno le-te identificirati ter preučiti možne posledice na rezultat. EMA dopušča možnost fenotipizacije in/ali genotipizacije iz varnostnih ali farmakokinetičnih razlogov. Dalje naj bi bili subjekti po priporočilih EMA pregledani glede ustreznosti s kliničnimi laboratorijskimi testi, pregledom zdravstvene zgodovine in fizičnim pregledom (1).

5.2. Število subjektov

Najmanjše število subjektov, vključenih v BE študijo, naj bi bilo po priporočilih EMA kot tudi FDA 12 (1, 6).

EMA navaja, da naj bi število prostovoljcev, vključenih v študijo temeljilo na ustreznem izračunu velikosti vzorca (1). FDA ima nekoliko podrobnejša priporočila o določitvi velikosti vzorca (9). V splošnem naj bi skupno število subjektov v študiji zagotavljalo ustrezno moč študije za dokaz BE (6). In sicer, naj bi bila velikost vzorca za povprečno BE dobljena z uporabo objavljenih formul, velikost vzorca za populacijsko in individualno BE pa naj bi temeljila na simuliranih podatkih (9). FDA priporoča, da je pri izbiri števila subjektov potrebno upoštevati tudi možne izstope (9).

6. Izvedba študije

6.1. Standardizacija

Z namenom zmanjšanja variabilnosti vseh v BE študiji vključenih dejavnikov, z izjemo tistih od formulacij, ki jih preizkušamo, naj bi bili pogoji preizkušanja v BE študiji standardizirani (1).

Tako EMA kot FDA tako priporočata standardizacijo hranjenja in vnosa tekočin (1, 6).

In sicer, ker lahko zaužitje tekočine vpliva na želodčni prehod peroralno aplicirane farmacevtske oblike, naj bi bilo tako testno kot tudi referenčno zdravilo aplicirano s standardiziranim volumnom tekočine (1). EMA priporoča aplikacijo zdravila z najmanj 150 ml tekočine (1), FDA je v priporočilu eksaktnejša, tj. 240 ml vode (6).

Omenjenemu priporočilu o vnosu tekočine ob aplikaciji zdravila EMA in FDA za BE študije s hrano dodajata še priporočilo o vnosu testnega obroka. Le-tega naj bi prostovoljci po priporočilih obeh regulatornih agencij začeli jesti 30 minut pred aplikacijo zdravila in ga pojedli v 30 minutah ali manj. 30 minut po začetku obroka naj bi bilo aplicirano zdravilo.

Slednje FDA razlaga s tem, da so učinki hrane na biološko uporabnost običajno največji, kadar je zdravilo aplicirano kmalu po zaužitju obroka (6). Kakorkoli, v primeru, da v SmPC-ju originatorja obstajajo specifična priporočila o času aplikacije zdravila glede na vnos hrane, EMA priporoča, da je le-ta skladna s priporočili originatorja (1). Priporočila EMA in FDA glede sestave testnega obroka v študijah s hrano za farmacevtske oblike s takojšnjim kot tudi prirejenim sprošanjem so opisana v poglavju 3.1.2.2.

Pri opredeljevanju pogojev na tešče se obravnavani regulatorni agenciji nekoliko razlikujeta. In sicer, po priporočilih FDA naj bi bilo v BE študiji v pogojih na tešče prostovoljcem aplicirano zdravilo po vsaj 10 urnem postu preko noči (7). V primeru EMA pa je časovno obdobje pred aplikacijo zdravila, v katerem naj bi bili subjekti tešči, nekoliko krajše (tj. vsaj 8 ur) (1).

Po priporočilih EMA naj bi bil določen tudi čas zaužitja zdravila (1).

Obe obravnavani regulatorni agenciji podrobneje opredeljujeta tudi vnos tekočin in hranjenje po aplikaciji zdravila. In sicer, pred in med vsako fazo študije priporočata, da je prostovoljcem dovoljena voda po želji, z izjemo 1 ure pred in 1 ure po aplikaciji zdravila. Hrana pa naj ne bi bila dovoljena vsaj 4 ure po aplikaciji zdravila. Dalje naj bi bili obroki, aplicirani po aplikaciji zdravila, po priporočilih obeh regulatornih agencij standardizirani glede sestave in časa zaužitja. Medtem ko FDA ne omejuje časovnega obdobja, v katerem naj bi bili obroki standardizirani, pa EMA navaja, da naj bi bili le-ti standardizirani ustrezno časovno obdobje (npr. 12 ur) (1, 7).

Obe agenciji priporočata vzdržanost pitja alkohola pred in med študijo (1, 6). FDA obdobje vzdržanosti podrobneje določa, in sicer 24 ur pred vsako periodo zdravljenja in vse do odvzema zadnjega vzorca vsake periode (6). EMA priporoča, naj bi se subjekti vzdržali tudi ostalih pijač in hrane, ki lahko vplivajo na funkcijo obtočil, prebavil, jeter ali ledvic (npr. določenih sadnih sokov kot je grenivkin sok) v ustreznem obdobju pred in med študijo. Poleg tega po priporočilih EMA subjekti naj ne bi smeli sočasno jemati katerihkoli drugih zdravil (vključno s pripravki rastlinskega izvora) ustrezen časovni interval pred študijo kot tudi v času študije. Izjema so kontraceptivna sredstva, ki so dovoljena. V primeru, da je sočasno zdravljenje neizogibno in subjekt prejme druga zdravila, na primer za zdravljenje neželenih učinkov, kot so glavobol, pa je potrebno o uporabi poročati (odmerek in čas aplikacije) in preučiti morebitne učinke na rezultat študije. V določenih primerih pa je po mnenju EMA iz razlogov, povezanih z varnostjo ali prenašanjem, sočasna aplikacija zdravila (npr. opioidnih antagonistov, antiemetikov) potrebna pri vseh subjektih. V tem primeru je potrebno obravnavati tveganje za možne interakcije ali bioanalizne motnje, ki bi lahko vplivale na rezultat (1).

Zdravila, ki se po priporočilih SmPC uporabljajo izključno v kombinaciji z drugim zdravilom (npr. nekateri inhibitorji proteaz v kombinaciji z ritonavirjem) se lahko po mnenju EMA preučujejo bodisi kot kombinacija ali brez zdravila, ki naj bi se po priporočilih v SmPC apliciral sočasno (1). FDA priporočil za omenjena zdravila v svojih smernicah ne navaja.

Podobno FDA ne navaja posebnih priporočil za bioekvivalenčne študije endogenih snovi, medtem ko EMA priporoča, da naj bi bili v omenjenih bioekvivačenčnih študijah dejavniki, ki lahko vplivajo na izhodiščne vrednosti endogene snovi, če je mogoče, nadzorovani (npr. stog nadzor vnosa hrane) (1).

Ker lahko biološka uporabnost učinkovine zavisi od časov GI prehoda ter regionalnih pretokov krvi, EMA poleg omenjene standardizacije hrane in vnosa tekočin priporoča še standardizacijo telesne dejavnosti (1).

6.2. Vzorčenje

Časovni vzorci v biološki tekočini, običajno plazmi, naj bi bili odvzeti prostovoljcem tako, da se omogoči ustrezen opis celotne plazemske koncentracijske krivulje v odvisnosti od časa (tj. opis faze absorpcije, distribucije in eliminacije učinkovine). Medtem ko EMA priporoča, da je za doseganje slednjega potrebno zbrati zadostno število vzorcev (1), FDA za večino učinkovin priporoča odvzem 12-18 vzorcev na subjekta na odmerek, vključno z vzorcem, odvzetim pred aplikacijo odmerka (t.i. »predose« vzorcem) (6).

Torej, časi vzorčenja naj bi bili po priporočilih obeh agencij razporejeni na takšen način, da omogočajo točno oceno najvišje koncentracije učinkovine v krvi (C_{max}) in terminalne hitrostne konstante (λ_z) (6).

In sicer, za zagotovitev zanesljivih ocen najvišje izpostavljenosti naj bi bilo vzorčenje po priporočilih EMA in FDA načrtovano tako, da se izognemo, da je C_{max} prva točka koncentracijske krivulje v odvisnosti od časa (1, 6). Sicer obstaja vprašanje, ali je izmerjeni C_{max} pravi (6). FDA (6) v izognitev temu problemu priporoča izvedbo pilotne študije. Zbiranje vzorcev v zgodnjih časih med 5 in 15 minut po aplikaciji, kateremu sledi nadaljnje vzorčenje (npr. 2 – 5 vzorcev) v prvi uri po aplikaciji, naj bi po priporočilih FDA zadostovalo za oceno zgodnje največje koncentracije. Če upoštevamo to vzorčenje, s strani FDA podatki veljajo za ustrezne tudi kadar se najvišja opažena koncentracija pojavi v prvi časovni točki (6). EMA omenjenim priporočilom za zagotovitev zanesljive ocene najvišje izpostavljenosti v splošnem dodaja še pogosto vzorčenje okrog napovedanega t_{max} (1).

Podobno, kadar je potrebno določiti delni AUC, FDA priporoča pogosto vzorčenje na začetku s po možnosti vsaj dvema merljivima vzorcema pred pričakovanim t_{max} (6).

Za pridobitev natančne ocene terminalne hitrostne konstante (λ_z), ki je potrebna za zanesljivo oceno $AUC_{0 \rightarrow \infty}$, obe obravnavani regulatorni agenciji priporočata odvzem vsaj treh do štirih vzorcev v terminalni log-linearni fazi (6, 1).

Glede priporočil časa vzorčenja se EMA in FDA nekoliko razlikujeta. Medtem ko FDA priporoča, da naj bi vzorčenje trajalo vsaj tri ali več terminalnih razpolovnih dob učinkovine (6), EMA priporoča takšen čas vzorčenja, da se zagotovi zanesljiva ocena obsega izpostavljenosti. Slednja je dosežena, če je $AUC_{0 \rightarrow t}$ vsaj 80% $AUC_{0 \rightarrow \infty}$. Nasprotno, če je odstotek $AUC_{0 \rightarrow t} / AUC_{0 \rightarrow \infty}$ manj kot 80% v več kot 20% opazovanjih, je po mnenju EMA veljavnost študije lahko vprašljiva (1).

Kakorkoli pa za farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem po priporočilih EMA čas vzorčenja daljši od 72 h ni potreben, ne glede na razpolovno dobo učinkovine. AUC skrajšan pri 72 urah ($AUC_{0 \rightarrow 72h}$) se lahko tako uporabi kot alternativa $AUC_{0 \rightarrow t}$ za primerjavo obsega absorpcije, saj je po mnenju EMA absorpcijska faza za farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem v 72 urah končana (1). Tudi FDA ima za učinkovine z dolgo razpolovno dobo posebna priporočila, ki pa se nanašajo na vse peroralne farmacevtske oblike. In sicer se za

okarakteriziranje največje in celotne izpostavljenosti teh učinkovin lahko uporabljata C_{max} in primerno skrajšan AUC. Vendar je skrajšanje AUC na 72 ur ($AUC_{0 \rightarrow 72 \text{ ur}}$) sprejemljivo le pri učinkovinah, ki izkazujejo nizko intrasubjektivno variabilnost v distribuciji in klirensu, medtem ko je pri krajšanju AUC pri učinkovinah z visoko intrasubjektivno variabilnostjo v distribuciji in klirensu po priporočilih FDA potrebna previdnost (6). Omenjeni čas vzorčenja 72 ur FDA priporoča iz enakega razloga kot EMA, tj. da se zagotovi, da sta gastrointestinalni prehod (približno 2 do 3 dni) farmacevtske oblike in absorpcija učinkovine končana (6).

EMA v bioekvivalenčni smernici za farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem navaja tudi priporočila za vzorčenje v študijah po večkratni aplikaciji odmerka. In sicer naj bi bil v slednjih vzorec odvzet tik pred (v roku 5 minut) aplikacijo zdravila, zadnji vzorec pa znotraj 10 minut nominalnega časa za interval odmerjanja, s čimer se zagotovi natančna določitev $AUC_{0 \rightarrow T}$ (1).

Kadar se kot biološka tekočina za vzorčenje uporablja urin, EMA priporoča, da naj se le-ta običajno ne bi zbiral manj kot tri terminalne razpolovne dobe. Kakorkoli, v skladu s priporočili o vzorčenju v plazmi za farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem, tudi urin ni potrebno zbirati več kot 72 ur (1)

Poleg zgoraj omenjenih priporočil EMA glede vzorčenja v študijah po večkratni aplikaciji odmerka in vzorčenja urina, daje omenjena regulatorna agencija priporočila tudi za vzorčenje v bioekvivalenčnih študijah endogenih spojin. In sicer priporoča, da naj bi v študijah endogenih spojin vzorčenje omogočalo opredelitev izhodiščnega profila za vsak subjekt v vsaki periodi. Pogosto se izhodiščna raven določi na osnovi 2-3, vzorcev, odvzetih pred aplikacijo zdravila. V drugih primerih pa je potrebno vzorčenje v rednih časovnih presledkih 1-2 dni pred aplikacijo, da se upošteva nihanje v izhodišni vrednosti kot posledica cirkadianega ritma (glej točko 7.4) (1). FDA posebnih priporočil za omenjene primere bioekvivalenčnih študij ne daje.

Za gastro-rezistentne farmacevtske oblike daje EMA posebna priporočila glede vzorčenja. Želodčno praznjenje enoenotnih farmacevtskih oblik, ki ne razpadejo v želodu (npr. gastro-rezistentnih tablet), je dolgotrajno in zelo neredno, najverjetneje zaradi učinka interdigestivnega cikla znotraj migracijskega mioelektričnega kompleksa. Posledice tega učinka na gastro-rezistentno oblogo farmacevtskih oblik z zakasnjnim sproščanjem so zelo nepredvidljive: npr. če se sproščanje učinkovine pojavi pred želodčnim praznjenjem zaradi podaljšanega zadrževanja v želodcu lahko pride bodisi do razpada v želodcu ali pa je sproščanje močno zakasnjeno. V obeh primerih je mogoče dobiti neredne koncentracijske profile (bodisi takšne, ki ne obstajajo ali zelo zakasnjene). Zato naj bi bilo po priporočilih EMA obdobje vzorčenja pri omenjenih farmacevtskih oblikah načrtovano tako, da je mogoče dobiti merljive koncentracije, ob upoštevanju ne le razpolovne dobe učinkovine, ampak tudi možnosti za pojav tega učinka. To naj bi zmanjšalo tveganje za nepopolne koncentracijske profile v odvisnosti od časa. Zato, vendar le pod pogoji, da so časi vzorčenja načrtovani tako, da omogočajo opredelitev močno zakasnjene absorpcije in da je incidenca tega obnašanja opažena s primerljivo frekvenco tako pri testnem kot referenčnem zdravilu, se lahko ti nepopolni profili izključijo iz statistične analize, pod pogojem, da je bilo to napovedano v protokolu študije (3).

7. Značilnosti, ki jih je potrebno raziskati

7.1. Farmakokinetični parametri

V študijah določanja bioekvivalence po enkratni aplikaciji odmerka EMA in FDA priporočata določitev naslednjih farmakokinetičnih parametrov: $AUC_{0 \rightarrow t}$, $AUC_{0 \rightarrow \infty}$, C_{max} , t_{max} , λ_z in $t_{1/2}$ (1, 6). EMA omenjenim parametrom dodaja še rezidualno površino. Za farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem pa FDA dodaja še t_{lag} (t.i. »lag-time«), če je prisoten (7).

Kakorkoli, po priporočilih EMA v študijah farmacevtskih oblik s takojšnjim sproščanjem z obdobjem vzorčenja 72 ur in kjer je koncentracijo v 72 urah mogoče kvantificirati, $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ in rezidualne površine ni potrebno poročati, temveč zadostuje poročanje AUC, skrajšanega pri 72 urah ($AUC_{0 \rightarrow 72h}$) (1).

V določenih primerih pri peroralno apliciranih farmacevtskih oblikah s takojšnjim sproščanjem FDA poleg mer najvišje in celotne izpostavljenosti priporoča še določitev delnega AUC kot mere zgodnje izpostavljenosti. Slednji naj bi se določil pri zdravilih, pri katerih ustrezne raziskave klinične učinkovitosti/varnosti in/ali farmakokinetične/farmakodinamične študije zahtevajo večji nadzor absorpcije učinkovine v sistemski obtok (npr. za zagotovitev hitrega začetka analgetičnega učinka ali za izognitev prekomernemu hipotenzivnemu učinku antihipertenziva) (6). Delni AUC naj bi bil skrajšan v populacijski mediani t_{max} vrednosti referenčne formulacije (6).

V študijah določanja bioekvivalence v stacionarnem stanju obe regulatorni agenciji priporočata določitev $AUC_{0 \rightarrow T}$, $C_{max,ss}$, $t_{max,ss}$ in $C_{min,ss}$. Kakorkoli, po priporočilih EMA v primeru farmacevtskih oblik s takojšnjim sproščanjem $C_{min,ss}$ ni potrebno določiti (1). FDA poleg omenjenih farmakokinetičnih parametrov priporoča še določitev C_{av} , nihaja in fluktuacije.

Kadar se v bioekvivalenčnih študijah uporabljajo urinarni podatki, EMA priporoča določitev $Ae_{0 \rightarrow t}$ in, če je možno, R_{max} (1).

Opredelitve zgoraj omenjenih farmakokinetičnih parametrov so podane v spodnji preglednici (Preglednica 5).

Preglednica 5. Opredelitev FK parametrov (1, 6).

FK parameter	EMA	FDA
C_{max}	najvišja koncentracija, določena neposredno iz podatkov, brez interpolacije	
$C_{max,ss}$	najvišja koncentracija v stacionarnem stanju	
$C_{min,ss}$	/	koncentracija ob koncu intervala odmerjanja
t_{max}	čas, v katerem je dosežen C_{max}	
$t_{max,ss}$	čas v katerem je dosežen $C_{max, ss}$	
$AUC_{0 \rightarrow t}$	površina pod koncentracijsko krivuljo v odvisnosti od časa od časa nič oz. od aplikacije do časa t, kjer je t zadnja časovna točka z merljivo koncentracijo	
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$	površina pod koncentracijsko krivuljo v odvisnosti od časa ekstrapolirana do neskončnosti ($AUC_{0 \rightarrow t} + C_t/\lambda_z$, kjer je C_t zadnja merljiva koncentracija)	
$AUC_{0 \rightarrow 72h}$	površina pod koncentracijsko krivuljo v odvisnosti od časa od aplikacije do 72 ur	
$AUC_{0 \rightarrow \tau}$	površina pod koncentracijsko krivuljo v odvisnosti od časa od časa nič do časa τ v intervalu odmerjanja v stacionarnem stanju, kjer je τ dolžina intervala odmerjanja	
delni AUC	AUC skrajšan v populacijski mediani t_{max} vrednosti referenčne formulacije	
rezidualna površina	ekstrapolirana površina $((AUC_{0 \rightarrow \infty} - AUC_{0 \rightarrow t}) / (AUC_{0 \rightarrow \infty}))$	
$t_{1/2}$	terminalna razpolovna doba	
λ_z	terminalna hitrostna konstanta	
C_{av}	povprečna koncentracija med dozirnimi intervalom v stacionarnem stanju (AUC_{τ} / τ)	
nihaj	/	$(C_{max} - C_{min}) / C_{min}$
fluktuacija	/	$(C_{max} - C_{min}) / C_{av}$
$Ae_{0 \rightarrow t}$	kumulativna urinarna ekskrecija nespremenjene učinkovine od aplikacije do časa t	/
R_{max}	najvišja hitrost urinarnega izločanja	/

Po priporočilih EMA naj bi se za določitev farmakokinetičnih parametrov uporabljale ne-prostorske metode. Uporaba prostorskih metod za oceno parametrov ni sprejemljiva (1).

Medtem ko EMA priporoča, da se pri ocenjevanju parametrov uporabljajo dejanski časi vzorčenja (1), FDA zgolj priporoča, da se dejanski čas odvzema vzorcev kot tudi čas, ki je potekel od aplikacije zdravila, poroča (6).

7.2. Prvotna spojina ali metaboliti

Splošna priporočila

Tako EMA kot tudi FDA načeloma priporočata merjenje koncentracij prvotne spojine. Namreč, koncentracijski profil prvotne spojine v odvisnosti od časa velja kot bolj občutljiv na spremembe v obnašanju formulacije kot koncentracijski profil metabolita, ki bolj odraža nastanek, distribucijo in eliminacijo metabolita. Torej je C_{max} prvotne spojine običajno bolj občutljiv za odkrivanje razlik v hitrosti absorpcije med dvema formulacijama kot C_{max} metabolita (1, 6, 3).

Priporočila glede merjenja prvotne učinkovine in/ali metabolita v primeru problemov z občutljivostjo analizne metode

EMA uporabo metabolita kot nadomestek za aktivno prvotno spojino ne spodbuja. Po mnenju EMA je namreč slednje mogoče le, če lahko vlagatelj ustrezno utemelji, da občutljivost analizne metode za merjenje prvotne spojine ni mogoče izboljšati in da merjenje prvotne spojine po enkratni aplikaciji odmerka ni mogoče, pri čemer je potrebno upoštevati tudi možnost uporabe višjega enkratnega odmerka v bioekvivalenčni študiji (glej tudi točko 8.1). Namreč, zaradi nedavnega razvoja bioanalizne metodologije se zdi EMA nenavadno, da prvotne spojine ne bi bilo mogoče točno in natančno izmeriti. Zato je uporaba metabolita kot nadomestek za aktivno prvotno spojino s strani EMA sprejemljiva le v izjemnih primerih. Kadar pa se podatki za metabolit uporabljajo kot nadomestek za koncentracije aktivne prvotne učinkovine, naj bi vlagatelj predstavil kakršnekoli razpoložljive podatke, ki podpirajo vidik, da bo izpostavljenost metabolita odražala izpostavljenost prvotni učinkovini in da nastanek metabolita ni nasičena pri terapevtskih odmerkih (1)

Nasprotno pa je FDA glede merjenja zgolj metabolita v primeru problemov z občutljivostjo bioanalizne metode manj stroga. In sicer, kadar so ravni prvotne učinkovine prenizke, da bi omogočile zanesljive analize meritve v krvi, plazmi ali serumu, daje FDA prednost merjenju metabolita. In sicer priporoča, da se za metabolit uporabi pristop intervala zaupanja za dokaz bioekvivalence. Kakorkoli, kadar obstajajo klinični problemi v zvezi z učinkovitostjo ali varnostjo prvotne spojine, pa FDA priporoča, da se sponzorji in/ali vlagatelji obrnejo na ustrezne preiskovalne oddelke za določitev ali je potrebno izmeriti in statistično ovrednotiti tudi prvotno učinkovino (7).

Priporočila glede merjenja prvotne učinkovine in/ali metabolita v primeru signifikantnega prispevka metabolita k varnosti in/ali učinkovitosti

Metabolit lahko nastane že v enterocitih ali z drugim predsistemskim metabolizmom. Kadar metabolit pomembno prispeva k varnosti in/ali učinkovitosti, FDA priporoča merjenje obeh, metabolita in prvotne učinkovine. Kadar je relativna aktivnost metabolita nizka in ne prispeva pomembno k varnosti in/ali učinkovitosti, le-tega ni potrebno meriti. In sicer, FDA priporoča, da se v teh BE študijah prvotna učinkovina analizira z uporabno intervala zaupanja. Podatki metabolita pa se lahko uporabijo kot potrjen dokaz primerljivega terapevtskega izida (7).

EMA posebih priporočil v tem primeru ne navaja, se pravi, da v tem primeru zadostuje merjenje prvotne učinkovine (1).

Priporočila glede merjenja prvotne učinkovine in/ali metabolita v primeru neaktivnih predzdravil

EMA obravnava prvotno učinkovino kot neaktivno predzdravilo, kadar nima ali ima zelo majhen prispevek k klinični učinkovitosti. Tudi v teh primerih EMA priporoča merjenje prvotne učinkovine, medtem ko aktivnega metabolita po mnenju EMA ni potrebno meriti. Kakorkoli, nekatera predzdravila imajo lahko nizke koncentracije in se hitro eliminirajo, kar vodi do težav pri dokazovanju BE za prvotno spojino. V tem primeru je sprejemljivo dokazati BE za glaven aktiven metabolit brez merjenja prvotne spojine.

FDA posebnih priporočil glede merjenja prvotne učinkovine in/ali metabolita ne navaja. Kakorkoli lahko iz zgoraj navedenega sklepamo, da je v tem primeru potrebno merjenje obeh, prvotne učinkovine in metabolita, če le-to omogoča občutljivost analizne metode. Sicer zadostuje merjenje aktivnega metabolita.

7.3. Enantiomeri

Za BE študije FDA bioekvivalenčne smernica (6) priporoča merjenje racemata z uporabo akiralne analizne metode. Merjenje posameznih enantiomerov v BE študiji in dokaz BE za vsak enantiomer posebej pa je priporočljivo le, kadar so izpolnjeni vsi naslednji pogoji:

- (1) enantiomera izkazujeta različne farmakodinamske lastnosti,
- (2) enantiomera izkazujeta različne farmakokinetične lastnosti,
- (3) glavna učinkovitost in varnost pripadata manjšemu enantiomeru in
- (4) pri vsaj enem od enantiomerov je prisotna nelinearna absorpcija (izražena s spremembo v koncentracijskem razmerju enantiomerov pri spremembi hitrosti vnosa učinkovine).

Tudi po priporočilih EMA je v splošnem sprejemljiva akiralna bioanalizna metoda. Sicer pa je merjenje posameznih enantiomerov potrebno, kadar so izpolnjeni vsi od naslednjih pogojev ali pa so pogoji neznani:

- (1) enantiomera izkazujeta različno farmakokinetiko,
- (2) enantiomera izkazujeta izrazito razliko v farmakodinamiki,
- (3) razmerje izpostavljenosti (AUC) enantiomerov se spremeni z razliko v hitrosti absorpcije (1).

Čeprav so priporočila EMA glede merjenja enantiomerov na prvi pogled podobna tistim FDA (z izjemo FDA pogoja 3), pa je zaradi dejstva, da so zgoraj omenjeni pogoji EMA, predvsem pogoj 3, za večino učinkovin neznani, EMA v svojih priporočilih glede merjenja enantiomerov precej strožja od FDA. Namreč, medtem ko je v primeru EMA kiralna analizna metoda potrebna že v primeru, kadar je eden od zgoraj navedenih pogojev (tj. EMA pogoj 1-3) za učinkovino neznan, pri FDA zadostuje akiralna analizna metoda, razen če ni jasnega dokaza za vse zgoraj navedene razlike (tj. FDA pogoj 1-4) (6, 1).

Če je eden od enantiomerov farmakološko aktiven in drugi neaktiven ali ima majhen prispevek k aktivnosti, po priporočilih EMA zadostuje dokaz bioekvivalence za aktivni enantiomer (1).

7.4. Endogene snovi

EMA bioekvivalenčna smernica za farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem (1) navaja tudi posebna priporočila za bioekvivalenčne študije endogenih snovi. In sicer, kadar je preučevana snov endogena, naj bi bil izračun farmakokinetičnih parametrov po priporočilih EMA izveden z uporabo popravka na izhodiščno raven, tako da se izračunani farmakokinetični parametri nanašajo na dodatne koncentracije, povzročene z zdravljenjem. V bioekvivalenčnih študijah endogenih učinkovin se lahko premisli o aplikaciji supra-terapevtskih koncentracij pod pogojem, da se odmerek dobro prenaša, tako da se lahko dodatne koncentracije nad izhodiščno, povzročene z zdravljenjem, zanesljivo določijo. Če ločitev v izpostavljenosti po uporabi različnih odmerkov določene endogene snovi še ni bila predhodno določena, je to potrebno dokazati, bodisi v pilotni študiji ali kot del glavne bioekvivalenčne študije z uporabo različnih odmerkov referenčne formulacije, da se zagotovi, da je odmerek, ki se uporablja za BE primerjavo občutljiv za zaznavanje morebitnih razlik (1).

Metoda za popravek na izhodiščno raven naj bi bila po priporočilih EMA vnaprej določena in utemeljena v protokolu študije. V splošnem ima prednost standardna subtraktivna metoda popravka na izhodiščno raven, kar pomeni odštetje bodisi povprečnih koncentracij endogene snovi, odvzetih pred aplikacijo odmerka ali odštetje individualnih endogenih AUC pred aplikacijo odmerka. V redkih primerih, kjer je opaženo znatno povečanje nad izhodiščno ravno endogene spojine, popravek na izhodiščno raven ni potreben (1).

Ker v bioekvivalenčnih študijah z endogenimi snovmi direktna ocena pojava prenesenega učinka ni mogoča, EMA priporoča dodatno pazljivost, da se zagotovi, da je doba izpiranja dovolj dolga (1).

V smernicah FDA, obravnavanih v tem seminarju, posebnih priporočil glede bioekvivalenčnih študij endogenih snovi ni.

7.5. Zdravila, katerih učinkovine so kompleksne zmesi

Nasprotno pa FDA daje priporočila za zdravila, ki vsebujejo kompleksne učinkovine (tj. aktivne dele učinkovin ali učinkovine, ki so zmesi večih sestavin, sintetičnega in/ali naravnega izvora), pri čemer nekatere od teh sestavin ali vse sestavine teh kompleksnih učinkovin ne morejo biti okarakterizirane glede na kemijsko strukturo in/ali biološko aktivnost.

In sicer, po priporočilih FDA merjenje vseh aktivnih ali potencialno aktivnih komponent za dokaz BE ni zaželeno. Priporočajo, da BE študije temeljijo na majhnem številu označevalcev hitrosti in obsega absorpcije. Določitev označevalcev je potrebna od primera do primera. Kriteriji za izbor označevalcev vključujejo količino spojine v farmacevtski obliki, koncentracijo spojine v plazmi ali krvi in biološko aktivnost spojine v primerjavi z ostalimi sestavinami kompleksne zmesi. Kjer s farmakokinetičnimi pristopi ni mogoče oceniti hitrosti

in obsega absorpcije učinkovine iz zdravila, imajo lahko prednost *in vitro* pristopi. Farmakodinamski ali klinični pristopi pa so lahko zahtevani, kadar ni merljivih spojin za *in vivo* farmakokinetične ali *in vitro* študije (7).

EMA posebnih priporočil za bioekvivalenčne študije omenjenih farmacevtskih oblik ne navaja.

7.6. Uporaba urinarnih podatkov

Tako EMA kot tudi FDA priporočata uporabo krvi (1, 6). In sicer se v večini primerov učinkovina ali metaboliti merijo v serumu ali plazmi. Vendar pa je lahko v nekaterih primerih polna kri primernejša za analizo (6).

Uporaba podatkov urinarnega izločanja kot nadomestek za plazemske koncentracije je po mnenju EMA lahko sprejemljiva za določanje obsega izpostavljenosti le v primeru, kadar zanesljivo merjenje plazemskega koncentracijskega profila prvotne spojine v odvisnosti od časa ni mogoče. V primeru pa, da se urinarni podatki uporabljajo za oceno najvišje izpostavljenosti, je potrebno uporabo le-teh upravičiti. Namreč, če je zanesljivo oceno C_{max} v plazmi mogoče določiti, naj bi se za ocenjevanje bioekvivalence le-ta kombinirala z urinarnimi podatki o obsegu izpostavljenosti. Pri uporabi urinarnih podatkov naj bi vlagatelj predstavil vse razpoložljive podatke, ki podpirajo, da urinarna ekskrecija odraža plazemsko izpostavljenost (1).

8. Jakosti, ki jih je potrebno testirati

8.1. Farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem

Če testno zdravilo vsebuje več jakosti, zadostuje po priporočilih EMA dokaz BE na le eni ali dveh jakostih, odvisno od proporcionalnosti v sestavi med različnimi jakostmi in drugih vprašanj, povezanih z zdravilom. Jakost (jakosti) za oceno BE pa zavisi od linearnosti v farmakokinetiki učinkovine.

V primeru nelinearne farmakokinetike (tj. neproporcionalen porast v AUC s povečanjem odmerka) lahko med različnimi jakostmi obstajajo razlike v občutljivosti za zaznavanje morebitnih razlik med formulacijami. Po priporočilih EMA je farmakokinetika linearna, če razlika med z odmerkom prilagojenimi aritmetičnimi sredinami AUC ni večja od 25%, če primerjamo proučevano jakost (ali jakost v načrtovani BE študiji) z jakostjo (jakostmi), za katero nameravamo bioekvivalenčno študijo opustiti.

Za oceno linearnosti naj bi po priporočilih EMA vlagatelj upošteval vse razpoložljive podatke, ki so v javni lasti v zvezi s proporcionalnostjo odmerkov in le-te pregledal kritično. Ocena linearnosti bo s strani EMA upoštevana le, kadar bodo razlike v z odmerkom prilagojenim AUC ustrezale kriteriju $\pm 25\%$.

Če je bila bioekvivalenca dokazana na jakosti (jakostih), ki so najbolj občutljive za zaznavanje potencialnih razlik med formulacijami, se lahko po mnenju EMA *in vivo* bioekvivalenčne študije za ostale jakosti opustijo (1).

Podobno tudi v primeru FDA opustitev *in vivo* BE študij za različne jakosti zdravila in izbira jakosti za BE študijo zavisita v splošnem od proporcionalnosti v sestavi med različnimi

jakostmi oz. linearnosti v farmakokinetiki učinkovine. Kakorkoli pa za razliko od EMA, FDA (ne)linernosti farmakokinetike podrobneje ne opredeljuje (6).

Podrobneje so razlike med obravnavanima regulatornima agencijama predstavljene v nadaljevanju.

Splošni bioekvivalenčni kriteriji

Kadar se zahteva opustitev bioekvivalenčne študije za dodatno jakost (jakosti) morajo biti po priporočilih EMA izpolnjene naslednje splošne zahteve:

- a) zdravila so proizvedena na istem mestu z istim proizvodnim procesom oz. tehnologijo,
- b) kvalitativna sestava različnih jakostih je enaka,
- c) sestava jakosti je kvantitativno proporcionalna, tj. razmerje med količino vsake od pomožnih snovi in količino učinkovine (učinkovin) je enako za vse jakosti (pri farmacevtskih oblikah s takojšnjim sproščanjem ni potrebno, da tem pravilu sledijo sestavine obloge, ovojnice kapsule, barvila in dišave),
Če obstajajo odstopanja od kvantitativno proporcionalne sestave je pogoj c še vedno izpolnjen, če spodaj navedena pogoja i) in ii) ali i) in iii) veljata za jakost, uporabljeno v bioekvivalenčni študiji in jakost (jakosti), za katere se namerava opustiti bioekvivalenčno študijo:
 - i. količina učinkovine (učinkovin) znaša manj kot 5% mase tabletnega jedra ali mase vsebine kapsule
 - ii. količine različnih pomožnih snovi jedra tablete ali vsebine kapsule so enake za vse jakosti in je spremenjena le količina učinkovine
 - iii. količina polnila je spremenjena na račun spremembe v količini učinkovin. Količine ostalih pomožnih snovi jedra tablete ali vsebine kapsule pa so enake za vse jakosti.
- d) ustrezni podatki *in vitro* sproščanja potrjujejo ustreznost opustitve dodatnega *in vivo* bioekvivalenčnega testiranja (glejte točko 11).

V primeru FDA so pogoji potrebni za odobritev opustitve bioekvivalenčnih študij za dodatne jakosti v splošnem podobni tistim priporočenim s strani EMA. In sicer, po priporočilih FDA je lahko opustitev ene ali več *in vivo* študij za različne jakosti zdravila odobrena, kadar:

- a) je zdravilo v enaki farmacevtski obliki, vendar v različnih jakostih,
- b) je jakost proporcionalno podobna v učinkovinah in pomožnih snoveh z jakostjo zdravila, na kateri je isti proizvajalec izvedel ustrezno *in vivo* študijo in
- c) nova jakost ustreza primernim *in vitro* testom sproščanja (glej poglavje *In vitro* testi sproščanja).

Kakorkoli pa se obravnavani regulatorni agenciji precej razlikujeta v opredelitvi proporcionalne podobnosti. Medtem ko EMA dovoljuje zgolj odstopanja od proporcionalnosti v sestavinah obloge, ovojnice kapsule, barvilnih in dišavah, pa je FDA v svoji opredelitvi proporcionalnosti v sestavi nekoliko ohlapnejša, tj. poleg odstopanj v zgoraj omenjenih pomožnih snoveh (barvila, dišave, sestavine obloge) dovoljuje odstopanja v količini drugih pomožnih snovi, razlog za odstopanje v masi med različnimi jakostmi pa je lahko drug kot zgolj količina učinkovine, kot je to sprejemljivo v primeru EMA. In sicer, FDA opredeljuje proporcionalno podobnost na naslednje načine:

- Vse učinkovine in pomožne snovi so v popolnoma enakem razmerju med različnimi jakostmi (npr. 50 mg tableta ima natanko polovico vseh pomožnih snovi tablete 100 mg jakosti).
- Aktivne in neaktivne sestavine niso v povsem enakem razmerju med različnimi jakosti, kot je to navedeno zgoraj, vendar so razmerja pomožnih snovi glede na celotno maso farmacevtske oblike v mejah, opredeljenih v SUPAC-IR (13) in SUPAC-MR smernicah (14) do vključno ravni II (6). Spremembe nivoja I in II za farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem so prikazane v preglednici 6.

Preglednica 6. Spremembe nivoja I in II za farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem (13).

Spremembe nivoja I	Spremembe nivoja II
Odstranitev ali delna odstranitev pomožne snovi, katere namen je vplivati na barvo ali okus zdravila ali zamenjava sestavine tiskarskih barv z drugo odobreno sestavino	Sprememba v tehničnem razredu pomožne snovi (Primer: Avicel PH102 vs. Avicel PH200.)
Spremembe v pomožnih snoveh, izražene v odstotkih (m/m) mase celotne formulacije, ki so manjše ali enake naslednjim razponom odstotkov: <ul style="list-style-type: none"> ▪ polnilo ± 5 ▪ razgrajevalo – škrob ± 3, druga razgrajevala ± 1 ▪ vezivo ± 0.5 ▪ mazivo – kalcijev ali magnezijev stearat ± 0.25, ostala maziva ± 1 ▪ drsilo – smukec ± 1, ostala drsila ± 0.1 ▪ filmska obloga ± 1 	Spremembe v pomožnih snoveh, izražene v odstotkih (m/m) mase celotne formulacije, večje od v tabeli navedenih sprememb za raven I sprememb, vendar manjše ali enake naslednjim razponom odstotkom: <ul style="list-style-type: none"> ▪ polnilo ± 10 ▪ razgrajevalo – škrob ± 6, druga razgrajevala ± 2 ▪ vezivo ± 1 ▪ mazivo – kalcijev ali magnezijev stearat ± 0.5, ostala maziva ± 2 ▪ drsilo – talc ± 2, ostala drsila ± 0.2 ▪ filmska obloga ± 2

- Za učinkovine z visoko jakostjo, kjer je količina učinkovine v farmacevtski obliki razmeroma nizka, skupna masa farmacevtske oblike ostaja skoraj enaka za vse jakosti (znotraj $\pm 10\%$ skupne mase jakosti, na kateri je bila izvedena bioekvivalenčna študija), enake pomožne snovi so uporabljene za vse jakosti in sprememba v katerikoli jakosti je dobljena s spremembo količine učinkovin in ene ali več pomožnih snovi. Spremembe v pomožnih snoveh pa so znotraj mej, opredeljenih v SUPAC-IR in SUPAC-MR smernicah do vključno ravni II (glej Preglednici 6 in 7).

Izjeme zgornjih opredelitev pa so po priporočilih FDA mogoče, če se zagotovi ustrezna utemeljitev (6).

Izbira jakosti za študijo

Po priporočilih obeh obravnavanih regulatornih agencij naj bi bila bioekvivalenčna študija v splošnem izvedena na najvišji jakosti. Kakorkoli pa se EMA in FDA v odstopanjih od tega splošnega priporočila nekoliko razlikujeta. Medtem ko je v primeru FDA izbira študije na jakosti, ki ni najvišja, sprejemljiva zgolj iz razlogov varnosti, pa so priporočila EMA glede

izbire jakosti za BE študijo precej kompleksnejša. V splošnem pri omenjeni regulatorni agenciji o izbiri jakosti za BE študijo poleg varnosti odločajo še nekateri drugi dejavniki, kot so topnost učinkovine v primeru učinkovin z linearno farmakokinetiko in razlog za nelinearno farmakokinetiko v primeru učinkovin z manj kot sorazmernim povečanjem AUC s povečanjem odmerka. V primeru problemov, povezanih z občutljivostjo analize metode pa tako EMA kot tudi FDA dovoljujeta uporabo višjega odmerka od najvišje jakosti (po možnosti z uporabo več enot najvišje jakosti), pri čemer pa naj bi bil po priporočilih FDA celotni enkratni odmerek znotraj predpisanega območja odmerkov, medtem ko je lahko leta v primeru EMA v določenih primerih višji od najvišjega terapevtskega odmerka (6, 1). Podrobnejša priporočila EMA in FDA o izbiri jakosti za BE študijo pa so predstavljena v nadaljevanju.

Torej, kot že omenjeno, je po priporočilih FDA izvedba študije na jakosti, ki ni najvišja, lahko sprejemljiva zgolj iz razlogov varnosti, pod pogojem, da so izpolnjeni tudi naslednji pogoji:

- dokazana linearna kinetika eliminacije v območju terapevtskih odmerkov,
- višje jakosti testnega in referenčnega zdravila so proporcionalno podobne nižjim jakostim,
- primerjalno testiranje sproščanja na najvišji jakosti testnega in referenčnega zdravila je predloženo in ugotovljeno kot primerno (6, 12).

Nasprotno pa je lahko iz analiznih razlogov apliciranih več enot najvišje jakosti, pod pogojem, da celoten enkratni odmerek ostane znotraj predpisanega območja odmerkov (6). Priporočila glede jakosti, na kateri naj bi se izvedla bioekvivalenčna študija za FDA vlaganja so navedene v Oranžni knjigi (6).

Priporočila EMA glede izbire jakosti za študijo pa se delijo na tista za učinkovine z linearno farmakokinetiko in tista z nelinearno farmakokinetiko.

In sicer, za zdravila z linearno farmakokinetiko, pri katerih so izpolnjeni vsi zgoraj navedeni pogoji a) do d), zadostuje dokaz bioekvivalence na eni sami jakosti. Kot že omenjeno, naj bi bila v splošnem bioekvivalenca izvedena na najvišji jakosti. Za zdravila z linearno farmakokinetiko in pri katerih je učinkovina dobro topna (glej točko 15) pa je po mnenju EMA izbira nižje jakosti prav tako sprejemljiva. Izbira nižje jakosti je upravičena tudi, kadar navišja jakost ne more biti aplicirana zdravim prostovoljcem iz razlogov povezanih z varnostjo/prenašanjem. Nasprotno, če težave povezane z občutljivostjo analize metode izključujejo dovolj natančno merjenje koncentracij v plazmi po enkratni aplikaciji odmerka najvišje jakosti, EMA dovoljuje izbiro višjega odmerka (po možnosti z uporabo več tablet najvišje jakosti). Izbrani odmerek je lahko višji od najvišjega terapevtskega odmerka pod pogojem, da je ta enkratni odmerek dobro prenašan pri zdravih prostovoljcih in da pri tem odmerku ni omejitev absorpcije oz. topnosti.

Priporočila EMA o izbiri jakosti za BE študijo pri učinkovinah z nelinearno kinetiko se dalje delijo še na tista za učinkovine z več kot proporcionalnim povečanjem AUC s povečanjem odmerka in tista za učinkovine z manj kot proporcionalnim povečanjem AUC s povečanjem odmerka.

In sicer, za učinkovine z nelinearno farmakokinetiko, za katero je značilno več kot proporcionalno povečanje AUC s povečevanjem odmerka v razponu terapevtskih odmerkov, je bioekvivalenčno študijo po priporočilih EMA v splošnem potrebno izvesti na najvišji jakosti. Tako kot pri zdravilih z linearno farmakokinetiko je lahko nižja jakost upravičena,

kadar najvišja jakost ne more biti aplicirana zdravim prostovoljcem iz razlogov povezanih z varnostjo/prenašanjem. Prav tako je lahko primeru problemov z občutljivostjo analize metode uporabljen višji odmerek v skladu z zgoraj navedenimi priporočili za zdravila z linearno farmakokinetiko.

Za učinkovine z manj kot proporcionalnim povečanjem AUC s povečevanjem odmerka v terapevtskem območju odmerkov pa naj bi bila bioekvivalenca v večini primerov dokazana na najvišji jakosti in najnižji jakosti (oziroma jakosti v linearnem območju), torej sta v tem primeru potrebni dve bioekvivalenčni študiji. Če nelinearnost ni posledica omejene topnosti, vendar je npr. posledica nasičenja prenašalcev privzema in pod pogojem, da so zgornji pogoji a) do d) izpolnjeni in testno in referenčno zdravilo ne vsebujejo kakršnihkoli pomožnih snovi, ki lahko vplivajo na gastrointestinalno motiliteto ali prenašalne proteine, pa zadostuje dokaz bioekvivalence na najnižji jakosti (ali jakosti v linearnem območju). Podobno kot zgoraj je izbira drugih jakosti lahko upravičena, če problemi z občutljivostjo analize metode preprečujejo študijo na najnižji jakosti ali če najvišja jakost ne more biti aplicirana zdravim prostovoljcem iz razlogov povezanih z varnostjo/prenašanjem (1).

Bioekvivalenčna študija v pogojih s hrano naj bi bila po priporočilih FDA v splošnem izvedena na najvišji jakosti zdravila, ki se namerava tržiti. Izvedba študije na nižji jakosti farmacevtske oblike je lahko sprejemljiva v primeru, da se lahko le-to upraviči z vidika klinične varnosti (7). EMA pri farmacevtskih oblikah s takojšnjim sproščanjem ne daje posebnih priporočil glede jakosti, na kateri naj bi se izvedla BE študija s hrano (1).

Pristop skrajnosti

Kadar je bioekvivalenčna ocena potrebna na več kot dveh jakostih, npr. zaradi odklona od proporcionalne sestave, se lahko po priporočilih EMA uporabi pristop skrajnosti. V tem primeru je lahko sprejemljiva izvedba dveh bioekvivalenčnih študij, če izbrani jakosti predstavljata skrajnosti, npr. najvišjo in najnižjo jakost ali dve jakosti, ki se najbolj razlikujeta v sestavi, tako da so morebitne razlike v sestavi preostalih jakosti zajete z izvedenima študijama.

Kadar pa je potrebna ocena bioekvivalence za oba stanja, na tešče in s hrano, in pri dveh jakostih zaradi nelinearne absorpcije ali odstopanja od proporcionalne sestave, po priporočilih EMA zadostuje izvedba bioekvivalenčne študije v stanju na tešče in s hrano na eni sami jakosti. Opustitev bodisi študije na tešče ali s hrano za drugo jakost (jakosti) pa je lahko utemeljen na podlagi predhodnega znanja in/ali farmakokinetičnih podatkov iz študije, izvedene na jakosti, testirani v obeh pogojih, na tešče in s hrano. Izbrani pogoj (na tešče ali s hrano) za testiranje druge jakosti (drugih jakosti) naj bi bil tisti, ki je najbolj občutljiv za zaznavanje razlik med zdraviloma (1).

FDA teh možnosti ne navaja.

Fiksne kombinacije

Pogoji v zvezi s proporcionalno sestavo morajo biti po priporočilih EMA pravtako izpolnjeni za vse učinkovine fiksnih kombinacij. Pri določanju količine vsake učinkovine v fiksni kombinaciji pa je lahko druga učinkovina (učinkovine) po mnenju EMA obravnavana kot pomožna snov. V primeru dvoslojnih tablet je potrebno vsako plast obravnavati neodvisno. FDA posebnih priporočil za omenjene farmacevtske oblike na navaja.

8.2. Farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem

8.2.1. Farmacevtske oblike s podaljšanim sproščanjem

V primeru enoenotnih farmacevtskih oblik s podaljšanim sproščanjem z več jakostmi je po priporočilih EMA za vsako jakost potrebna študija po enkratni aplikaciji odmerka pod pogoji na tešče. Študije v stacionarnem stanju se lahko izvedejo na najvišji jakosti le, če so izpolnjeni vsi od naslednjih pogojev:

- a) zdravila so proizvedena z istim proizvajalcem in tehnologijo,
- b) linearna farmakokinetika v terapevtskem območju odmerkov (če farmakokinetika ni linearna v terapevtskem območju odmerkov, je potrebno uporabiti jakosti, kjer je občutljivost za identifikacijo razlik največja),
- c) enaka kvalitativna sestava pri različnih jakostih,
- d) enako razmerje med količinami učinkovine in pomožnimi snovmi ali, v primeru, da je v zdravilu koncentracija učinkovine nizka (manj kot 5%), enako razmerje med količinami pomožnih snovi,
- e) podobni profili sproščanja pod enakimi pogoji za dodatne jakosti in jakost serije, uporabljene v bioekvivalenčni študiji (19).

Nasprotno pa FDA v primeru enoenotnih farmacevtskih oblik s podaljšanim sproščanjem (tableta) zadostuje zgolj študija po enkratni aplikaciji v pogojih na tešče na najvišji jakosti. *In vivo* dokaz BE ene ali več nižjih jakosti pa je lahko oproščen v primeru, da so izpolnjeni vsi od naslednjih pogojev:

- a) profili sproščanja so primerljivi med jakostmi (glej točko 11.2);
- b) jakosti so med seboj proporcionalno podobne v učinkovini in pomožnih snoveh;
- c) enak mehanizem sproščanja pri vseh jakostih (6).

Za opredelitev proporcionalne podobnosti v sestavi po FDA glej točko 8.1. Spremembe nivoja I in II za farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem pa so prikazane v spodnji preglednici.

Za večeno farmacevtsko obliko s podaljšanim sproščanjem, ki izkazuje linearno farmakokinetiko pri več jakostih, pa po priporočilih EMA zadostuje študija po enkratni aplikaciji odmerka v pogojih na tešče na najvišji jakosti, pod pogojem, da so sestave nižjih jakosti proporcionalne sestavi višje jakosti, formulaciji vsebujeta enake kroglice ali pelete in da so profili sproščanja sprejemljivi.

FDA je v primeru omenjenih farmacevtskih oblik pravtako sprejemljiva le študija na najvišji jakosti po aplikaciji enkratnega odmerka v pogojih na tešče z opustitvijo *in vivo* študij za nižje jakosti, ki temelji na profilih sproščanja (glej točko 11.2). Pogoja za linearnost kinetike, ki ga srečamo pri EMA, pri FDA ni (6).

Obe obravnavani regulatorni agenciji priporočata izvedbo bioekvivalenčne študije s hrano na najvišji jakosti (3, 7). FDA dodatno omenja možnost izvedbe študije na nižji jakosti farmacevtske oblike v primeru, da se lahko to z vidika klinične varnosti upraviči (7).

Preglednica 7. Spremembe nivoja I in II za farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem (14).

Spremembe nivoja I	Spremembe nivoja II
Odstranitev ali delna odstranitev pomožne snovi, katere namen je vplivati na barvo ali okus zdravila ali zamenjava sestavine tiskarskih barv z drugo odobreno sestavino.	Sprememba v tehničnem razredu pomožne snovi in/ali specifikacijah pomožnih snovi, ki ne kontrolirajo sproščanja učinkovine iz farmacevtske oblike (Primer: Avicel PH102 vs. Avicel PH200.)
<p>Spremembe v pomožnih snoveh, ki ne kontrolirajo sproščanja učinkovine iz farmacevtske oblike, izražene v odstotkih (m/m) mase celotne formulacije, ki so manjše ali enake naslednjim razponom odstotkov:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ polnilo ± 5 ▪ razgrajevalo – škrob ± 3, druga razgrajevala ± 1 ▪ vezivo ± 0.5 ▪ mazivo – kalcijev ali magnezijev stearat ± 0.25, ostala maziva ± 1 ▪ drsilo – smukec ± 1, ostala drsila ± 0.1 ▪ filmska obloga ± 1 	<p>Spremembe v pomožnih snovi, izražene v odstotkih (m/m) mase celotne formulacije, večje od v tabeli navedenih za raven I sprememb, vendar manjše ali enake naslednjim razponom odstotkom (ki predstavljajo 2-kratni porast sprememb nivoja 1):</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ polnilo ± 10 ▪ razgrajevalo – škrob ± 6, druga razgrajevala ± 2 ▪ vezivo ± 1 ▪ mazivo – kalcijev ali magnezijev stearat ± 0.5, ostala maziva ± 2 ▪ drsilo – smukec ± 2, ostala drsila ± 0.2 ▪ filmska obloga ± 2

8.2.2. Farmacevtske oblike z zakasnjnim sproščanjem

Za tablete z zakasnjnim sproščanjem so po priporočilih EMA uporabne splošne zahteve za opustitev bioekvivalenčne študije za dodatno jakost, ki trenutno veljajo za farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem (3) (glej zahteve pod točko 8.2.1).

Q&A dokument (EMA/618604/2008 Rev. 1) (3) zgoraj omenjeni kriterij glede proporcionalnosti sestave (glej točko 8.2.1) v primeru omenjenih farmacevtskih oblik še nekoliko dopolnjuje. In sicer je pri vrednotenju proporcionalnosti v sestavi priporočljivo preučiti sorazmernost gastrorezistentne obloge glede na površino (in ne maso jedra) (mg/cm^2). Namreč, le v tem primeru se lahko šteje, da imajo jakosti enako gastrorezistenco (3).

Izbira uporabljene jakosti mora biti utemeljena (farmakokinetično, analitično in na osnovi varnosti) (3). V splošnem je izbira odmerka za FO z zakasnjnim sproščanjem podobna tisti pri farmacevtskih oblikah s takojšnjim sproščanjem (glej točko 8.1).

FDA za farmacevtske oblike z zakasnjnim sproščanjem z več jakostmi zadostuje študija enkratnega odmerka v pogojih na tešče na najvišji jakosti. Pogoji, ki naj bi bili pri tem izpolnjeni, so enaki kot v primeru farmacevtskih oblik s podaljšanim sproščanjem. Torej, v primeru večletnih farmacevtskih oblik z zakasnjnim sproščanjem je *in vivo* dokaz BE ene

ali več nižjih jakosti lahko opuščen na osnovi podobnosti profilov sproščanja (glej točko 11.2), pri enoenotnih farmacevtskih oblikah (tableta) pa je teh pogojev več: profili sproščanja so primerljivi med jakostmi (glej točko 11.2), jakosti so med seboj proporcionalno podobne v učinkovini in pomožnih snoveh in mehanizem sproščanja je enak pri vseh jakostih (6).

Podobno kot pri farmacevtskih oblikah s podaljšanim sproščanjem tudi pri farmacevtskih oblikah z zakasnenim sproščanjem FDA in EMA priporočata izvedbo bioekvivalenčne študije s hrano na najvišji jakosti (3, 7). FDA dodatno omenja možnost izvedbe študije na nižji jakosti farmacevtske oblike v primeru, da se lahko to z vidika klinične varnosti upraviči (7).

9. Bioanalizna metoda

Bioanalizni del bioekvivalenčnih študij je potrebno izvesti v skladu z načeli Dobre laboratorijske prakse (DLP).

Analizne metode za kvantitativno ovrednotenje učinkovin in njihovih metabolitov (analitov) so kritične za uspešno izvedbo bioekvivalenčnih študij. Uporabljene bioanalizne metode naj bi bile po priporočilih obeh regulatronih agencij dobro okarakterizirane, validirane in dokumentirane (1, 15).

Namen validacije je dokazati zanesljivost posamezne metode za kvantitativno določanje koncentracije analita (analitov) v biološkem matriksu. Glavne značilnosti bioanalizne metode, ki so bistvenega pomena za zagotavljanje sprejemljivosti izvedbe in zanesljivosti analiznih rezultatov so po priporočilih obeh obravnavanih regulatronih agencij naslednje:

- stabilnost raztopin (tj. osnovnih in delovnih raztopin),
- stabilnost analita (analitov) v biološkem matriksu pod pogoji izvajanja analize v celotnem obdobju shranjevanje,
- specifičnost oz. selektivnost,
- točnost,
- natančnost,
- limita kvantifikacije in
- linearnost kalibracijske, krivulje (1, 15).

Pri validaciji bioanalizne metode naj bi sledili posebnim smernicam, in sicer na področju EMA smernici z naslovom »Guideline on Validation of Bioanalytical Methods« (EMEA/CHMP/EWP/192217/2009; Draft) (5) in na področju FDA pa smernici z naslovom »Bioanalytical Method Validation« (15).

EMA v bioekvivalenčni smernici za farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem dodaja priporočilo za izbiro spodnje meje kvantifikacije. In sicer naj bi le-ta znašala $1/20 C_{\max}$ ali manj, saj naj bi bile koncentracije v vzorcih, odvzetih pred aplikacijo odmerka, detektirane pri $5\% C_{\max}$ ali nižje (glej točko 10.2).

Po priporočilih FDA (15) naj bi bila reanaliza vzorcev študije izvedena skladno z vnaprej definiranim SOP-om. Po priporočilih EMA pa naj bi bila le-ta predhodno (tj. pred dejanskim

začetkom analize vzorcev) definirana v protokolu študije in/ali SOP-u. Medtem ko FDA smernice ne dajejo posebnih priporočil oz. omejitev glede razlogov za ponovitve, pa EMA v bioekvivalenčni smernici za farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem navaja, da ponovitve vzorcev subjekta iz farmakokinetičnih razlogov niso sprejemljive, saj lahko le-te vplivajo na rezultat BE študije (1).

EMA v omenjeni smernici še dodaja, da naj bi bila analiza vzorcev izvedena brez podatkov o zdravljenju (1).

10. Ovrednotenje

Medtem ko FDA ne daje posebnih priporočil glede prilagajanja razlik v vsebnosti med testnim in referenčnim zdravilom pri izračunu farmakokinetičnih parametrov, pa po priporočilih EMA farmakokinetični parametri v splošnem ne smejo biti prilagojeni na razlike v vsebnosti testne in referenčne serije. Vendar pa je v izjemnih primerih, kadar referenčne serije, ki se v vsebnosti razlikuje za manj kot 5% od testnega zdravila ni mogoče najti, po mnenju EMA popravek vsebnosti lahko sprejemljiv. Kakorkoli, kadar se popravek vsebnosti namerava uporabiti, mora biti le-ta po priporočilih EMA vnaprej določen in utemeljen v protokolu z vključitvijo rezultatov iz določanja vsebnosti testnega in referenčnega zdravila (1).

10.1. Parametri, ki jih je potrebno analizirati in sprejemljive meje

V študijah dokazovanja bioekvivalence po enkratni aplikaciji odmerka sta po priporočilih EMA parametra, ki ju je potrebno analizirati $AUC_{0 \rightarrow t}$ ali, kadar je to ustrezno, $AUC_{0 \rightarrow 72h}$ in C_{max} (1). Po priporočilih FDA naj bi bil 90% interval zaupanja za razmerje populacijskih geometričnih sredin med tesno in referenčno formulacijo poleg za C_{max} in $AUC_{0 \rightarrow t}$ podan tudi za $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (7). Za omenjene parametre naj bi bil 90% interval zaupanja za razmerje testne in referenčne formulacije znotraj sprejemljivega intervala 80-125% (1).

V študijah dokazovanja bioekvivalence v stacionarnem stanju je potrebno po priporočilih EMA analizirati parametre $AUC_{0 \rightarrow T}$, $C_{max,ss}$ in $C_{min,ss}$ z uporabo enakih mej sprejemljivosti kot so navedene zgoraj (2, 1). Izjema so farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem, pri katerih zadostuje le analiza parametrov $AUC_{0 \rightarrow T}$ in $C_{max,ss}$ (1). Za razliko od EMA pa FDA ne daje posebnih priporočil glede parametrov, ki jih je potrebno analizirati v študijah v stacionarnem stanju (6, 9).

V določenih primerih, kjer se lahko uporabijo urinarni podatki, EMA priporoča analizo $Ae_{0 \rightarrow t}$ z uporabo enakih sprejemljivih kriterijev kot navedeno zgoraj za $AUC_{0 \rightarrow t}$. R_{max} pa je potrebno analizirati z uporabo enakega intervala sprejemljivosti kot za C_{max} (1).

Po priporočilih EMA in FDA statistična analiza parametra t_{max} ni potrebna (1, 6). Vendar pa, kadar je pri farmacevtskih oblikah s takojšnjim sproščanjem hitro sproščanje pomembno za

začetek delovanja ali se nanaša na neželene učinke, EMA priporoča, da naj ne bi bilo očitnih razlik v madiani t_{max} in njegovi variabilnosti med testnim in referenčnim zdravilom (1). Podobno EMA tudi za enoenotne farmacevtske oblike z zakasnenim sproščanjem priporoča, da se zlasti za zdravila, pri katerih je pomemben hiter nastop delovanja, ocenijo razlike v t_{max} . (3). Tudi s strani FDA se v splošnem pričakuje, da sta t_{max} vrednosti za referenčno in testno zdravilo primerljivi glede na klinični pomen (7).

V primeru EMA je v posebnih primerih pri zdravilih z ozkim terapevtskim območjem, interval sprejemljivosti potrebno zožiti (glej točko 12). Nadalje je mogoče interval sprejemljivosti za C_{max} visoko variabilnih učinkovin v določenih primerih razširiti (glej točko 13) (1).

Obe obravnavani regulatorni agenciji priporočata podajanje intervala zaupanja z dvema decimalnima mestoma. Torej, da smo znotraj sprejemljivega BE intervala 80% - 125%, mora biti po priporočilih obeh obravnavanih regulatornih agencij spodnja meja $\geq 80.00\%$ in zgornja meja $\leq 125.00\%$ (6, 1). Kakorkoli, medtem ko FDA priporoča, da se vrednosti intervala zaupanja naj ne bi zaokroževale, EMA ne daje priporočil glede zaokroževanja intervala zaupanja. Zaokroževanje na dve decimalni mesti je po priporočilu omenjene agencije potrebno zgolj z namenom ugotovitve, ali ustrezamo sprejemljivemu intervalu 80.00% - 125.00% (1).

10.2. Statistična analiza

Pristop ekvivalence je bil in je še vedno priporočljiv za primerjave v bioekvivalenčnih študijah. Priporočeni pristop temelji na (1) kriteriju, ki omogoča primerjavo, (2) intervalu zaupanja za kriterij in (3) BE limiti.

Pred statistično analizo EMA in FDA priporočata logaritemsko transformacijo mer biološke uporabnosti (npr. AUC in C_{max}). Za nadaljno primerjavo mer BU tako iz študij z neponovljenim kot tudi ponovljenim načrtom pa obe regulatorni agenciji za farmacevtske oblike s takojšnjim in prirejenim sproščanjem priporočata uporabo metode povprečne bioekvivalence (6, 1). In sicer, naj bi ocena bioekvivalence temeljila na 90% intervalih zaupanja za razmerje populacijskih geometričnih sredin med testno in referenčno formulacijo za obravnavane parametre (glej točko 10.1). Ta metoda je ekvivalentna dvojnemu enostranskemu testu z ničto hipotezo o nebioekvivalenci pri 5% stopnji signifikance.

Obravnavani farmakokinetični parametri naj bi bili analizirani z uporabo parametrične metode (ANOVA) (9, 1). Kot že omenjeno, je potrebno pred analizo parametre logaritemsko transformirati. Iz ANOVA modela je tako dobljen interval zaupanja za razliko aritmetičnih sredin logaritemsko transformiranih podakov med formulacijama. Antilogaritmiranje dobljenih mej zaupanja predstavlja 90% interval zaupanja za razmerje geometričnih sredin med formulacijama (1, 9). Neparometrična analiza po priporočilih EMA ni sprejemljiva (1).

Model za analizo mora biti vnaprej natančno določen v protokolu. Statistična analiza mora upoštevati vire variabilnosti, za katere se lahko upravičeno domneva, da imajo vpliv na spremenljivko odziva. Na primer, če je bil uporabljen navzkrižni načrt z dvema

periodama in dvema sekvencama, naj bi ANOVA model vključeval sekvenco, subjekt znotraj sekvence, periodo in formulacijo (1, 8). Za vse izraze EMA priporoča uporabo fiksnih raje kot naključnih učinkov (1).

Medtem ko imajo po priporočilih FDA izmed parametričnih postopkov (9) pri analizi neponovljenih navzkrižnih načrtov prednost t.i. splošni linearni modeli, ki so na voljo v PROC GLM v SAS-u ali ekvivalentni programski opremljeni ter pri analizi ponovljenih navzkrižnih načrtov postopki linearnega modela mešanih učinkov, ki so na voljo v PROC MIXED v SAS-u ali enakovredni programski opremljeni, EMA ne daje specifičnih priporočil glede uporabljenih postopkov in programske opreme (1). Kakorkoli, priporočilo EMA, da naj bi bili za vse izraze uporabljeni fiksni učinki raje kot naključni učinki kaže na preferiranje PROC GLM (1).

Po priporočilih EMA se test za preneseni učinek ne zdi kot pomemben, kot tudi naj se na podlagi takšnega testa ne bi izvajale nadaljne odločitve v zvezi z analizo (npr. analiza le prve periode). Možnost za preneseni učinek je lahko neposredno ocenjena s pregledom plazemskih koncentracij, odvzetih pred aplikacijo v periodi 2 (in dalje, če je primerno). V primeru, da obstajajo subjekti, za katere so koncentracije pred aplikacijo odmerka večje od 5% vrednosti C_{max} za subjekt v tisti periodi, je potrebno statistično analizo ponoviti z izključitvijo podatkov subjekta za tisto periodo. V načrtu z dvema periodama bo to rezultiralo v izključitvi subjekta iz analize. V primeru, da bodo te izključitve rezultirale v manj kot 12 subjektih, razpoložljivih za analizo, s strani EMA študija ne bo več sprejemljiva. Ta pristop ne velja za endogene spojine (1).

Obravnava prenesenega učinka po priporočilih FDA se nekoliko razlikuje. Le-ta za razliko od EMA testiranju neenakih prenesenih učinkov pripisuje nekoliko večji pomen. V standardnem navzkrižnem načrtu namreč po mnenju FDA v primeru, da s testom sekvence možnosti neenakih prenesenih učinkov ni mogoče izključiti, nepristranske ocene za $\mu_T - \mu_R$ na podlagi znotrajsubjektnih primerjav ni mogoče dobiti (9), pri čemer sta μ_T in μ_R populacijski aritmetični sredini logaritemsko transformirane mere za testno oz. referenčno formulacijo. Kakorkoli, pa je podobno kot EMA tudi FDA mnenja, da je v primeru, da je doba izpiranja med periodami študije zadostna in vzorci, odvzeti pred aplikacijo odmerka, ne kažejo zaznavnih ravni učinkovine pri nobenem od subjektov, možnost neenakih prenesenih učinkov tako pri ponovljenih kot tudi neponovljenih navzkrižnih načrtih malo verjetna. Kot druge pogoje za zmanjšanje verjetnosti za neenake prenesene učinke FDA navaja še na primer študijo po enkratnem odmerku, spojine ne-endogene narave, primerno validirano analizo metodo. Možnost neenakih prenesenih učinkov je lahko po mnenju FDA zmanjšana tudi v študijah po večkratni aplikaciji odmerka in/ali v študijah na pacientih, pod pogojem, da učinkovina ni endogene narave in da študije izpolnjujejo vsa zgoraj navedene pogoje. V vseh drugih okoliščinah FDA zahteva, da se preuči možnost neenakih prenesenih učinkov. Če obstajajo dokazi o prenesenih učinkih, naj bi sponzorji opisali predlagane pristope v protokolu študije, vključno s statističnimi testi za prisotnost teh učinkov in postopke, ki jih je potrebno upoštevati. Kadar se domneva, da so preneseni učinki možni, je po mnenju FDA sprejemljiva izvedba BE študije z vzporednim načrtom (9).

Podobno kot EMA tudi FDA priporoča, da se subjekti s koncentracijami, odvzetimi pred aplikacijo odmerka, $>5\% C_{max}$ pri posameznem subjektu izključijo iz vseh vrednotenj BE študije (6).

Čeprav je povprečna BE priporočljiva za primerjavo mer BU v večini BE študij, FDA smernica o statističnih pristopih za dokazovanje bioekvivalence (9) opisuje dva nova

pristopa - populacijsko in individualno bioekvivalenco. Slednja sta lahko v nekaterih primerih koristna za analizo *in vitro* in *in vivo* BE študij (9). Pristop povprečne bioekvivalence se namreč osredotoča le na primerjavo populacijskih povprečij BE mer in ne na variance teh mer za testno in referenčno zdravilo. Poleg tega metoda povprečne BE ne ocenjuje variance interakcije med subjektom in formulacijo, tj. variabilnosti v povprečni razliki med testnim in referenčnim zdravilom med posamezniki. V nasprotju s to metodo pa pristopa populacijske in individualne BE vključujeta primerjave obeh, povprečij in varianc mere. Pristop populacijske BE ocenjuje celokupno variabilnost mere v populaciji. Pristop individualne BE pa ocenjuje intrasubjektivno variabilnost za testno in referenčno zdravilo, kot tudi interakcijo med subjektom in formulacijo (9).

Kadar se uporablja povprečni ali populacijski pristop dokazovanja bioekvivalence se lahko po priporočilih FDA uporablja neponovljeni načrt, kot je standardni navzkrižni načrt z dvema formulacijama, dvema periodama in dvema sekvencama. Ponovljeni navzkrižni načrt pa se lahko uporablja ne glede na to, kateri pristop je bil izbran za dokaz bioekvivalence. Uporaba slednjega pa je kritična, kadar se uporablja pristop individualne BE, saj omogoča oceno intrasubjektivnih variabilnosti za mere testne in referenčne formulacije in varianco interakcije med subjektom in formulacijo (9).

10.3. Vključitev/izključitev podatkov

Po priporočilih EMA naj bi bile v statistično analizo vključene vse obravnavane osebe z izjemo subjektov, ki ne dajejo podatkov za obe zdravili, testno in referenčno zdravilo, ali tistih, ki ne dajejo podatkov za edino periodo v primeru študije z vzporednim načrtom (1). Poleg tega naj bi bili podatki vseh subjektov obravnavani enako. Protokol, ki določa, da bodo 'rezervne' osebe vključene v analizo le, če bo to potrebno kot nadomestilo za druge subjekte, ki so bili izključeni, po mnenju EMA ni sprejemljiv. Po priporočilih EMA je namreč potrebno načrtovati, da bodo v analizo vključeni vsi obravnavani subjekti, tudi v primeru da ne bo nobenih izstopov (1). Za razliko od EMA pa FDA dovoljuje možnost, da vzorci nadomestnih subjektov niso uporabljeni, v primeru, da to ni potrebno. Kakorkoli pa FDA priporoča, da naj sponzorji, ki nameravajo v času študije zamenjati izstope, to navedejo v protokolu študije. V protokolu je potrebno tudi navesti, ali bodo vzorci nadomestnih subjektov analizirani tudi v primeru, če ne bodo uporabljeni. V primeru, da je stopnja izstopov visoka in želijo sponzorji dodati več subjektov, FDA priporoča modifikacijo statistične analize. Po končani analizi pa podatki dodatnih subjektov ne smejo biti vključeni, razen če ni bila študija načrtovana kot zaporedni načrt (9). Sicer pa v splošnem FDA priporoča, naj izstopi ne bi bili nadomeščeni, saj lahko zamenjava subjektov med študijo po mnenju FDA oteži statistični model in analizo (9).

V študijah z npr. tremi periodami, ki vključujejo dve referenčni zdravili, od katerih je ena iz EU in druga iz USA ali štirimi periodami, ki vključujejo testno in referenčno zdravilo v stanju na tešče in s hrano, EMA priporoča, da naj bi bila vsaka od primerjav izvedena z izključitvijo podatkov ostalih zdravljenj, ki niso pomembna za primerjavo (1).

Nepriistranska ocena rezultatov randomiziranih študij po zahteva, da so vsi subjekti opazovani in obravnavani v skladu z istimi pravili, ki naj bi bili neodvisni od zdravljenja ali

izida. Posledično je po priporočilih EMA potrebno odločitev o izključitvi subjekta iz statistične analize sprejeti pred bioanalizo (1).

Načeloma je kakršenkoli razlog za izključitev veljaven, če je določen v protokolu in je odločitev o izključitvi sprejeta pred bioanalizo. Kakorkoli EMA priporoča, da se je izključitvi podatkov potrebno izogibati, saj se s tem zmanjšuje moč študije, za oceno pa je potrebnih najmanj 12 subjektov (1).

Kot primere razlogov za izključitev rezultatov subjekta v določeni periodi EMA navaja dogodke kot so bruhanje in driska, zaradi katerih lahko plazemski koncentracijski profil v odvisnosti od časa postane nezanesljiv. V izjemnih primerih je lahko po mnenju EMA tudi sočasna uporaba zdravil razlog za izključitev subjekta (1).

Po priporočilih EMA naj bi bili dovoljeni razlogi za izključitev vnaprej določeni v protokolu študije. Če se eden od teh dogodkov pojavi, pa mora biti med izvedbo študije zabeležen v CRF. Poleg tega EMA priporoča, da naj bi bila izključitev subjektov na podlagi vnaprej določenih kriterijev jasno opisana in navedena v poročilu študije (1).

S strani EMA izključitev podatkov zgolj na osnovi statistične analize ali farmakokinetičnih razlogov ni sprejemljiva, ker učinke formulacije ni mogoče razlikovati od ostalih učinkov, ki vplivajo na farmakokinetiko (1). Izjeme so naslednje:

- 1) Subjekti, pri katerih so koncentracije za referenčno zdravilo zelo nizke ali celo nemerljive. Po priporočilih EMA velja, da ima subjekt zelo nizke plazemske koncentracije, kadar je njegov AUC manjši od 5% geometrične sredine AUC referenčnega zdravila (ki naj bi bila izračunana brez vključitve podatkov tega subjekta osamelca). Kakorkoli, bo izključitev podatkov zaradi omenjenega razloga s strani EMA sprejeta le v izjemnih primerih, saj je veljavnost študije v primeru pojava omenjenih koncentracij po mnenju EMA lahko vprašljiva.
- 2) Subjekti z izhodiščnimi koncentracijami $>5\% C_{max}$. Takšni podatki naj bi bili izključeni iz bioekvivalenčnega izračuna.

Za farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem je lahko slednje po mnenju EMA posledica ne-komplajensa subjekta ali neustrezne dobe izpiranja. V največji možni meri se jima je potrebno izogniti s pregledom ust subjekta takoj po zaužitju preiskovanega zdravila, s čimer se zagotovi, da je subjekt pogoltnil zdravilo, in načrtovanjem študije z ustrezno dolgo dobo izpiranja. Vzorce subjektov, izključenih iz statistične analize, je kljub temu potrebno analizirati in rezultate predstaviti (glej točko 10.5) (1).

Dalje naj bi po priporočilih EMA $AUC_{0 \rightarrow t}$ pokrival vsaj 80% $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (glej točko 6.2). Kakorkoli naj subjekti ne bi bili izključeni iz statistične analize v primeru, da je ta odstotek manjši. Vendar, če je odstotek manjši od 80% v več kot 20% opazovanj, je po mnenju EMA veljavnost študije lahko vprašljiva in jo je potrebno utemeljiti. To ne velja, kadar je obdobje vzorčenja 72 ur ali več in se namesto $AUC_{0 \rightarrow t}$ uporablja $AUC_{0 \rightarrow 72h}$ (1).

FDA je v svojih priporočilih glede odstranitve podatkov subjektov iz statistične analize, ki so doživeli bruhanje med BE študijo, natančnejša. In sicer priporoča, da se podatki subjektov, ki so doživeli bruhanje med BE študijo odstranijo iz statistične analize, če se pri farmacevtskih oblikah s takojšnjim sproščanjem bruhanje pojavi v ali pred časom 2 kratne vrednosti mediane T_{max} . V primeru farmacevtskih oblik s prirejenim sproščanjem pa se lahko odstranijo podatki subjektov, ki so doživeli bruhanje v kateremkoli času med predpisanim dozirnim intervalom (6).

Podobno kot EMA tudi FDA osamelcev na splošno ne priporoča, zlasti pri neponovljenih načrtih. Namreč, tudi če je nenavaden odziv opažen za referenčno zdravilo, lahko po

mnenju FDA še vedno obstaja zaskrbljenost glede medsebojne zamenljivosti dveh zdravil. Nasprotno po mnenju FDA pri ponovljenih navzkrižnih načrtih narava ponovljenega preskušanja teh načrtov kaže, ali naj bi bila vrednost osamelca izbrisana ali ne (9).

Medtem ko EMA izraza osamelec niti ne omenja, ga FDA definira. In sicer FDA opredeljuje podatke osamelce v BE študijah kot tiste podatke subjektov za eno ali več mer BU, ki so neskladni z ustreznimi podatki tega subjekta in/ali ostalih subjektov v študiji. Ker so BE študije običajno izvedene kot navzkrižne študije, je po mnenju FDA najpomembnejši tip osamelcev pri subjektih osamelec znotraj subjekta, kjer se en subjekt ali nekaj subjektov razlikujejo od ostalih subjektov predvsem po znotrajsubjektu primerjavi med testnim in referenčnim zdravilom. Obstoj osamelcev pri subjektih brez kakršnihkoli kršitev protokola lahko kaže na eno od naslednjih situacij:

- neuspeh zdravila
Do neuspeha zdravila lahko pride na primer, kadar subjekt izkazuje nenavadno visok ali nizek odziv pri enem od zdravil zaradi problema z določeno enoto farmacevtske oblike. To se lahko zgodi na primer pri farmacevtskih oblikah s podaljšanim in/ali zakasnjnim sproščanjem, pri izkazujejo t.i. »dose dumping« ali v primeru enot z oblogo, ki zavira sproščanje.
- interakcija med subjektom in formulacijo (9).
Interakcija med subjektom in formulacijo se lahko pojavi, kadar je posameznik predstavnik subjektov, ki so v splošni populaciji prisotni v majhnem številu, za katere je relativna BU dveh zdravil bistveno drugačna kot za večino populacije in za katere dve zdravili nista bioekvivalentni, čeprav sta lahko bioekvivalentni pri večini populacije.

Ostalih vidikov vključitve/izključitve subjektov, ki jih opredeljuje EMA, opisanih zgoraj, FDA ne obravnava.

10.4. Študije v več skupinah

Medtem ko EMA možnosti izvajanja študij v več skupinah ne omenja (z izjemo spodaj navedenega dvo-stopenjskega načrta), daje FDA priporočila o statističnem ovrednotenju omenjenih študij. In sicer, če je navzkrižna študija izvedena v dveh ali več skupinah oseb (npr., če je lahko iz logističnih razlogov naenkrat preučevanih le omejeno število subjektov), je po priporočilih FDA potrebno statistični model prilagoditi v takšni meri, da odraža naravo študije v več skupinah. Zlasti mora model odražati dejstvo, da so periode prve skupine različne od period druge skupine.

Če pa je študija izvedena v dveh ali večih skupinah in so te skupine preučevane na različnih kliničnih mestih, ali na istem mestu, a časovno precej ločene (npr., mesece), se po mnenju FDA lahko pojavijo vprašanja, ali se lahko rezultati posameznih skupin združijo v eno analizo (9).

V smernicah obeh obravnavanih regulatornih agencij pa srečamo priporočila o posebni vrsti načrta v skupinah, t.i. dvo-stopenjskem (1) oz. zaporednem načrtu (9), v katerem odločitev za preučevanje druge skupine subjektov temelji na rezultatih prve skupine (9). Omenjeni načrt je sprejemljiv za dokaz bioekvivalence tako s strani EMA kot FDA, pri čemer daje EMA nekoliko podrobnejša priporočila o izvedbi in statističnem ovrednotenju študij z dvo-

stopenjskim načrtom. In sicer, po priporočilih EMA je začetna skupina subjektov lahko tretirana in njihovi podatki analizirani. Če bioekvivalenca na tej skupini subjektov ni bila dokazana, se lahko zbere dodatna skupina subjektov in rezultati obeh skupin kombinirajo v končni analizi (1). Po mnenju FDA je v tem primeru potreben drugačen statističen model, ki pa je izven obsega FDA smernice o statističnih pristopih za ovrednotenje bioekvivalence (9). FDA zato svetuje, da naj se tisti, ki želijo uporabiti zaporedni načrt, posvetujejo z ustreznim oddelkom CDER (9). EMA pa priporoča, da se obe analizi (tj. vmesna analiza na začetni skupini subjektov in končna analiza) izvedejo pri prilagojenem nivoju signifikance (z intervali zaupanja v skladu s prilagojeno verjetnostjo, ki je višja od 90%). Na primer, uporaba 94.12% intervala zaupanja za obe analizi, analizo prve faze in analizo, ki združuje podatke prve in druge faze, bi bila po priporočilih EMA sprejemljiva. Kakorkoli po mnenju EMA obstaja še veliko sprejemljivih alternativ in izbira α za vmesno analizo je odvisna od presoje sponzorja. Načrt uporabe dvo-stopenjskega pristopa naj bi bil po priporočilih EMA vnaprej določen v protokolu skupaj s prilagojeno stopnjo signifikance, uporabljeno za vsako od analiz. Pri analizi združenih podatkov iz obeh faz pa naj bi se v ANOVA model vključil izraz faza (1).

10.5. Predstavitev podatkov

Za vsakega prostovoljca, ki sodeluje v študiji, je potrebno po priporočilih obeh obravnavanih regulatornih agencij predstaviti podatke o koncentraciji učinkovine določene v biološki tekočini v vsaki časovni točki in farmakokinetične parametre (glej točko 7.1). Individualne koncentracije in farmakokinetični parametri naj bi bili razvrščeni po formulaciji skupaj s statističnim povzетkom, kot so aritmetična sredina, standardna deviacija, koeficient variacije in geometrična sredina, v primeru EMA še mediana ter najnižja in najvišja vrednost (9, 1). Po priporočilih EMA naj bi bila metoda, uporabljena za izpeljavo farmakokinetičnih parametrov iz neobdelanih podatkov, določena. Določeno naj bi bilo tudi število točk terminalne log-linearne faze, uporabljenih za oceno terminalne konstante hitrosti, ki je potrebna za zanesljivo oceno $AUC_{0-\infty}$ (1).

EMA poleg omenjenih tabelaričnih prikazov individualnih koncentracij zahteva grafičen prikaz individualnih koncentracijskih krivulj v odvisnosti od časa na linearni in semi-logaritemski skali (1).

Za farmakokinetične parametre, ki so bili predmet statistične analize, je potrebno predstaviti razmerje in 90% interval zaupanja za razmerje testne in referenčne formulacije (1 6). FDA priporoča še predstavitev intrasubjektne variabilnosti ali celotne variabilnosti, če je na voljo (6). EMA pa priporoča predložitev ANOVA tabel, vključno z ustreznimi statističnimi testi vseh učinkov v modelu (1).

Po priporočilih EMA bi moralo biti poročilo dovolj podrobno, da se lahko farmakokinetična in statistična analiza ponovi. Na primer, potrebno je zagotoviti podatke o dejanskem času vzorčenja krvi po aplikaciji, koncentracije učinkovine, vrednosti farmakokinetičnih parametrov za vsak subjekt v vsaki periodi in randomizacijsko shemo (1). Podobno tudi FDA poleg že omenjenih plazemskih koncentracij in časovnih točk priporoča poročanje dejanskega časa odvzema vzorcev, kot tudi časa, ki je potekel od aplikacije zdravila ter predložitev randomizacijske sheme (1).

Izstope in izključitev subjektov iz študije naj bi bilo po priporočilih EMA v celoti dokumentirano. Če so na voljo, naj bi bili predstavljeni tudi koncentracijski podatki in farmakokinetični parametri teh subjektov, vendar naj ne bi bili vključeni v povzetek statistike (1). FDA posebnih priporočil o predstavitvi podatkov izstopov in izključenih subjektov ne navaja (6).

Po priporočilih EMA in FDA mora biti bioanalizna metoda dokumentirana v poročilu o validaciji pred študijo. Bioanalizno poročilo mora biti pravtako prikazano in naj bi po priporočilih obeh vsebovalo kratek opis uporabljene bioanalizne metode in rezultate točnosti in natančnosti kalibracijskih in kontrolnih vzorcev znotraj študije. Poleg tega naj bi poročilo vsebovalo tudi reprezentativno število kromatogramov ali drugih neobdelanih podatkov, ki pokrivajo celotno koncentracijsko območje za vse standardne vzorce in kontrolne vzorce kot tudi analizirane vzorce (tj. kompletne kromatograme vsaj 20% subjektov s kontrolnimi vzorci in kalibracijskimi standardi sekvenc, ki vključujejo te subjekte).

10.6. Predložitev in vrednotenje podatkov iz več bioekvivalenčnih študij

FDA (11) in EMA (1) v splošnem zahtevata, da vlagatelj generičnih zdravil predloži podatke iz vseh BE študij, ki so bile izvedene na formulaciji zdravila, ki je bila predložena v odobritev, vključno s študijami, ki ne dokazujejo, da generično zdravilo izpolnjuje veljavne bioekvivalenčne kriterije. Podatki iz katerekoli dodatne BE študije so lahko po mnenju FDA pomembni pri odločitvi, ali je zdravilo bioekvivalentno z referenčnim zdravilom in pri vrednotenju generičnih zdravil na splošno. Ti podatki naj bi namreč povečali njihovo razumevanje razvoja generičnih zdravil in kako lahko spremembe v sestavinah in sestavi vplivajo na obnašanje formulacije (11).

Vse BE študije izvedene na formulaciji zdravila, ki je bila predložena v odobritev (tj. enaka sestava in proizvodnji proces), je potrebno po priporočilih obeh obravnavanih regulatornih agencij predložiti kot popolno poročilo študije za BE študije, na osnovi katerih vlagatelj prosi za odobritev.

FDA poleg omenjenega zahteva še predložitev povzetka poročila študije za vsako dodatno BE študijo, izvedeno na enaki formulaciji zdravila. Slednjo opredeljuje kot formulacijo zdravila, ki je bila predložena v odobritev in katerekoli druge formulacije, ki imajo manjše razlike v sestavi ali metodi proizvodnje v primerjavi s formulacijo, predloženo v odobritev, vendar so dovolj podobne, da so pomembne za odločitev o bioekvivalenci. Definicija enake formulacije zdravila velja ne glede na to, ali so bila zdravila proizvedena na istih ali različnih proizvodnih mestih.

V primerjavi s FDA pa je EMA v svojih zahtevah glede predložitve podatkov dodatnih bioekvivalenčnih študij še nekoliko strožja. Namreč, poleg povzetkov poročil pilotnih študij, izvedenih na formulaciji, predloženi v odobritev, zahteva predložitev povzetkov poročil vseh bioekvivalenčnih študij, izvedenih med razvojem formulacije (1).

V primeru, da je predložen le povzetek poročila študije in je regulatorna agencija mnenja, da obstajajo vprašanja in skrbi v zvezi z zdravilom, lahko le-ta zahteva predložitev popolnega poročila študije (11, 1).

EMA dalje priporoča, da naj bi vlagatelj temeljito razpravljajal o rezultatih relevantnih BE študij (tj. študij, ki so bile izvedene na formulaciji zdravila, ki je bila predložena v odobritev) in upravičil trditev, da je bioekvivalenca dokazana. Namreč, po mnenju EMA obstoj študij, ki dokazujejo bioekvivalenco še ne pomeni, da lahko ignoriramo tiste, ki bioekvivalence ne dokazujejo. Druga možnost, kadar je to primerno, je kombinirana analiza vseh študij. Kakorkoli, združevanje zgolj študij, ki ne dokazujejo bioekvivalence, brez študij, ki dokazujejo bioekvivalenco, po mnenju EMA ni sprejemljivo (1).

11. *In vitro* testi sproščanja

Študije sproščanja lahko služijo več namenom. Med razvojem zdravila se test sproščanja uporablja kot orodje za ugotavljanje dejavnikov formulacije, ki vplivajo na biološko uporabnost učinkovine. Takoj ko sta opredeljena sestava in proizvodnji proces se test sproščanja uporablja v kontroli kakovosti zvečanja obsega proizvodnje in kontroli kakovosti proizvodnih serij za zagotovitev, da profili sproščanja ostanejo podobni profilom sproščanja na serijah iz bioekvivalenčnih študij in zagotovitev skladnosti med serijami. Poleg tega se lahko v nekaterih primerih test sproščanja uporablja za dokaz bioekvivalence (glej točko 15) (19).

11.1. *In vitro* testi sproščanja kot dopolnilo bioekvivalenčnim študijam

11.1.1. *Farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem*

Po priporočilih EMA je za farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem potrebno predstaviti rezultate *in vitro* testov sproščanja v treh različnih medijih (običajno pH 1.2, 4.5, 6.8) in v mediju, ki je namenjen sproščanju zdravila (t.i. QC mediju). Profili sproščanja naj bi bili pridobljeni na serijah testne in referenčne formulacije, ki sta bili uporabljeni v bioekvivalenčni študiji. Posebne farmacevtske oblike, kot so oralne orodisperzibilne tablete (ODT), lahko zahtevajo uporabo različnih eksperimentalnih pogojev. Rezultate pa je potrebno prikazati kot profile odstotkov sproščene količine učinkovine v odvisnosti od časa (s prikazom aritmetičnih sredin in standardnih deviacij) (1). Nasprotno pa FDA pri farmacevtskih oblikah s takojšnjim sproščanjem zadostuje uporaba enega medija. In sicer priporoča uporabo ustrezne USP metode, če le-ta ni na voljo, pa uporabo FDA metode za referenčno zdravilo. Če USP in/ali FDA metoda nista na voljo pa priporoča razvoj metode sproščanja. V tem primeru naj be se testirali profili sproščanja pri različnih hitrostih mešanja (npr. 100-150 obratov/minuto za USP aparaturo I (aparatura s košarico) ali 50-100 obratov/minuto za USP aparaturo II (aparatura z veslastim mešalom)) v vsaj treh medijih sproščanja (npr. pufru s pH 1.2, 4.5 in 6.8). Tudi voda se lahko uporablja kot dodaten medij (6). FDA priporoča, da se izbere hitrost mešanja in medij, ki zagotavljajo zadostno diskriminatorno sposobnost, ob upoštevanju vseh razpoložljivih *in vitro* in *in vivo* podatkov (6).

Po mnenju EMA v primeru, da rezultati primerjave *in vitro* sproščanja serij, uporabljenih v bioekvivalenčni študiji, ne odražajo bioekvivalence, kot je bilo to dokazano *in vivo*, slednje prevlada. Vendar pa je potrebno možne razloge za neskladje obravnavati in utemeljiti (1). FDA smernice za takšne primere ne dajejo posebnih priporočil.

11.1.2. Farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem

Za *in vitro* testiranje farmacevtskih oblik s prirejenim sproščanjem v primeru EMA veljajo podobne zahteve kot za farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem (glej točko 11.1.1) (2). Nasprotno pa je FDA pri *in vitro* testiranju farmacevtskih oblik s prirejenim sproščanjem strožja kot je pri farmacevtskih oblikah s takojšnjim sproščanjem, tj. poleg uporabe ustrezne USP metode oz. uporabe FDA metode za referenčno zdravilo v primeru, da prva metoda ni na voljo, priporoča testiranje sproščanja vsaj še v treh drugih medijih za sproščanje (npr. pufru s pH 1.2, 4.5 in 6.8) in vodi (6). Torej sta obravnavani regulatorni agenciji po obsegu *in vitro* testov, ki jih zahtevata, primerljivejši pri farmacevtskih oblikah s prirejenim sproščanjem kot pri tistih s takojšnjim sproščanjem.

Po priporočilih EMA, navedenih v Q&A dokumentu (3), pa je za gastrorezistentne farmacevtske oblike potrebno primerjati profile sproščanja ne le v farmakopejskih pogojih (2 uri v pH 1.2, čemur sledi 45 minut pri pH 6.8), ampak tudi pri bolj nevtralnem pH v območju 2-5, tako za enoletne farmacevtske oblike, ki ne razpadajo kot tudi za večletne farmacevtske oblike, ki razpadajo. Zato sta potrebna vsaj dva poskusa sproščanja v dveh korakih. Prvi je primerjava profilov sproščanja pri farmakopejskih pogojih, 2 uri pri pH 1.2, kateremu sledi 45 minut v pH 6.8. V drugem poskusu sproščanja pa naj bi se uporabil višji začetni pH, ki posnema stanje s hrano, npr. 2 uri pri pH 4.5, čemur naj sledi 45 minut pri pH 6.8 (3). FDA za omenjene farmacevtske oblike zgolj priporoča, da se z *in vitro* testi sproščanja dokaže, da so le-te stabilne v kislih pogojih in da sproščanje učinkovino le v nevtralnem mediju (npr. pH 6.8) (6).

11.2. In vitro testi sproščanja kot podpora pristopa opustitve bioekvivalenčnih študij za jakosti

11.2.1. Farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem

Ustrezno *in vitro* sproščanje lahko služi kot popora za opustitev dodatnih *in vivo* bioekvivalenčnih študij na ostalih jakostih, običajno na eni ali več nižjih jakostih (6, 1, 12).

V ta namen je potrebno preučiti sproščanje pri različnih pH vrednostih, razen če ni drugače utemeljeno (1). pH pogoji, ki jih je potrebno uporabiti po priporočilih obeh obravnavanih regulatornih agencij so vsaj trije, tj. pH 1.2, 4.5 in 6.8 (1, 6). Kakorkoli, FDA v določenih primerih zadostujejo profili sproščanja le v enem mediju (tj., kadar je bila postavljena ustrezna metoda sproščanja (glej točko 11.1.1) in rezultati sproščanja kažejo, da lastnosti sproščanja zdravila niso odvisne od jakosti zdravila) (6).

Podobnost *in vitro* sproščanja je po priporočilih EMA in FDA potrebno dokazati med različnimi jakostmi testnega zdravila, tj. med jakostjo, uporabljeno v bioekvivalenčni študiji in dodatnimi jakostmi testnega zdravila, pri vseh pogojih (6, 12, 1). Kakorkoli ima EMA pri pH vrednostih, kjer sink pogoji niso doseženi za vse jakosti in lahko zato *in vitro* sproščanje razlikuje med različnimi jakosti, še nekaj dodatnih zahtev. In sicer, po mnenju EMA naj bi v tem primeru primerjava z ustrežno jakostjo referenčnega zdravila potrdila, da je to opažanje dejansko posledica učinkovine in ni povezano s formulacijo. Poleg tega je potrebno dokazati podobnost profilov sproščanja pri enakem odmerku (npr. primerjava dveh 5 mg tablet vs. ena 10 mg tableta) (1).

Tako EMA kot FDA priporočata, da se za primerjavo profilov sproščanja različnih jakosti uporabi f_2 test (6). f_2 pristop ni primeren za farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem in % sproščene učinkovine > 85% v 15 minutah ali manj (6).

11.2.2. Farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem

Podobno kot pri *in vitro* testih sproščanja, ki jih uporabljamo kot dopolnilo bioekvivalenčnim študijam, tudi pri *in vitro* testi sproščanja, ki jih uporabljamo kot podpora opustitvi bioekvivalenčnih študij za jakosti, za farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem v primeru EMA veljajo podobne zahteve kot za farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem (2). Torej je potreben dokaz podobnosti profilov sproščanja v več medijih za sproščanje. V primeru FDA pa je pri omenjenih farmacevtskih oblikah dokaz podobnosti v vsaj treh medijih sproščanja (tj. pH 1.2 4.5 in 6.8) potreben le pri enoenotnih formulacijah (tabletah), medtem ko v primeru večenočnih formulacij zadostuje uporaba zgolj priporočene metode sproščanja (glej točko 11.1.2) (6).

Kar se tiče podobnosti profilov sproščanja, ki jo je potrebno dokazati znotraj različnih jakosti testnega zdravila oz. med dodatnimi jakostmi testnega zdravila in ustreznimi jakostmi referenčnega zdravila, veljajo pri farmacevtskih oblikah s prirejenim sproščanjem enaka priporočila kot ju obravnavani regulatorni agenciji navajata pri farmacevtskih oblikah s takojšnjim sproščanjem (glej točko 11.2.1). Pri enoenotnih farmacevtskih oblikah FDA dodaja še priporočilo o izvedbi profilov sproščanja na vseh jakostih referenčnega in ne le testnega zdravila (6).

Tako kot pri farmacevtskih oblikah s takojšnjim sproščanjem tudi pri farmacevtskih oblikah s prirejenim sproščanjem EMA in FDA priporočata uporabo f_2 testa.

11.3. Primerjava profilov sproščanja

Primerjava profilov sproščanja se lahko izvaja z uporabo od modela neodvisnih ali od modela odvisnih metod (12, 1). Kakorkoli pa je po priporočilih EMA kot metoda izbire predlagana primerjava profilov sproščanja z uporabo faktorja podobnosti (f_2). Uporaba drugih, alternativnih, od modela odvisnih kot tudi od modela neovisnih metod za dokaz podobnosti profilov sproščanja (npr. statistična multivariantna primerjava parametrov Weibull-ove funkcije ali odstotkov sproščene učinkovine v različnih časovnih točkah) pa je s

strani EMA sprejemljiva le, kadar f_2 statistika ni primerna. Poleg tega naj bi bile le-te statistično veljavne in zadovoljivo utemeljene (1).

Enostaven, pogosto uporabljen od modela neodvisen pristop za primerjavo profilov sproščanja uporablja faktor podobnosti (f_2) (12). Faktor podobnosti (f_2) je logaritemska recipročna transformacija kvadratnega korena vsote kvadratov napake in je merilo podobnosti v odstotkih (%) sproščanja med dvema krivuljama.

$$f_2 = 50 \cdot \log \left[\frac{100}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{t=1}^{t=n} [\bar{R}(t) - \bar{T}(t)]^2}{n}}} \right]$$

V tej enačbi je n število časovnih točk, $R(t)$ aritmetična sredina odstotka sproščene učinkovine referenčnega zdravila v času t po začetku študije in $T(t)$ aritmetična sredina odstotka sproščene učinkovine testnega zdravila v času t po začetku študije (12, 8, 1).

Pri vrednotenju faktorja podobnosti EMA in FDA priporočata upoštevanje naslednjih postavk:

- določitev dvanajstih individualnih vrednosti za vsako časovno točko za vsako formulacijo;
- najmanj tri časovne točke (časovna točka v času nič izključena);
- enake časovne točke za obe formulaciji;
- ne več kot ena srednja vrednost sproščene učinkovine za katerokoli od formulacij > 85%;
- relativna standardna deviacija ali koeficient variacije kateregakoli zdravila manjša od 20% v prvi časovni točki in manjša od 10% v drugih časovnih točkah (1, 12).

Profila sproščanja veljata za podobna, kadar je f_2 vrednost ≥ 50 (50-100) (1, 8, 12).

Kadar oba, testno in referenčno zdravilo, sprostita 85% ali več predpisane količine učinkovine v ≤ 15 minutah, primerjava profilov z f_2 testom ni potrebna (8, 1). Namreč, srednji čas ($T_{50\%}$) zadrževanja v želodcu (oz. želodčnega praznjenja) v pogojih na tešče znaša 15-20 minut (12). Na osnovi te informacije se zdravilo, ki sprosti 85% ali več predpisane količine učinkovine v 15 minutah obnaša kot raztopina. Torej, v teh primerih biološka uporabnost učinkovine ni omejena s sproščanjem, temveč je korak, ki omejuje hitrost absorpcije učinkovine, praznjenje želodca (12). Za farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem je tako primerjava sproščanja pri 15 minutah ključna. Namreč, v primerih, ko je več kot 85% učinkovine sproščene v 15 minutah se lahko predpostavlja, da je popolno sproščanje doseženo preden poteče praznjenje želodca, zaradi česar se lahko profila sproščanja sprejmeta kot podobna brez nadaljnjih matematičnih vrednotenj (1).

Slednje po priporočilih EMA (3) ne velja v primeru gastrorezistentnih formulacij, pri katerih sproščanje poteka v tankem črevesju in čas 15 minut, ki je sicer potreben za praznjenje želodca, nima fiziološkega pomena. V primeru gastrorezistentnih formulacij se namreč

sproščanje pojavi po praznjenju želodca. Torej naj bi bila primerjava profilov sproščanja izvedena tudi, če je sproščanje večje od 85% v 15 min pri obeh formulacijah oziroma jakostih. Priporoča se pogosto vzorčenje (npr. vsakih 5 minut) v obdobju hitre faze sproščanja (torej, po tem ko je zdravilo 2 uri izpostavljeno mediju, ki posnema okolje v želodcu (pH 1.2 ali 4.5) in nadaljna primerjava profilov sproščanja npr. z uporabo f_2 izračuna (3). Za razliko od EMA FDA nima posebnih priporočil za vzorčenje in dokaz podobnosti profilov sproščanja za gastrorezistentne farmacevtske oblike (6).

Kadar pa je sproščanje pri farmacevtskih oblikah s takojšnjim sproščanjem počasnejše od želodčnega praznjenja, se priporoča primerjava profilov sproščanja v več časovnih točkah (12). EMA na primer priporoča, da so v primeru, kadar se več kot 85% učinkovine ne sprosti v 15 minutah, vendar v 30 min, potrebne vsaj tri časovne točke: prva časovna točka pred časom 15 minut, druga v času 15 minut in tretja časovna točka, ko je sproščanje blizu 85% (1). V splošnem EMA za farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem priporoča, da naj bi bilo časovnih točk vzorčenja dovolj, vsaj vsakih 15 min. V obdobju največjih sprememb v profilih sproščanja pa priporoča še pogostejše vzorčenje. Za zdravila s hitrim sproščanjem, pri katerih je popolno sproščanje doseženo v 30 minutah, je po mnenju EMA potrebno vzorčenje v 5- ali 10-minutnih časovnih intervalih (1). Po priporočilih EMA so primerjava profilov sproščanja in kakršnikoli zaključki teh rezultatov (npr. utemeljitev za opustitev bioekvivalenčne študije) veljavni le, če so bili profili sproščanja ustrezno okarakterizirani z zadostnim številom časovnih točk (1).

12. Učinkovine z ozkim terapevtskim območjem

Stališče EMA in FDA glede bioekvivalenčnih zahtev za učinkovine z ozkim terapevtskim območjem se razlikuje (Preglednica 8).

Preglednica 8. Razlike v BE zahtevah pri učinkovinah z ozkim terapevtskim območjem med EMA in FDA.

FK parameter	EMA	FDA
AUC	v določenih primerih je interval sprejemljivosti potrebno zožiti na 90.00% - 111.11%	tradicionalne BE meje 80.00% - 125.00%
C_{max}	interval sprejemljivosti je potrebno zožiti na 90.00% - 111.11%, kadar je C _{max} še posebej pomemben z vidika varnosti, učinkovitosti in spremljanja koncentracij učinkovine	

EMA je mnenja, da je interval sprejemljivosti za AUC v posebnih primerih zdravil z ozkim terapevtskim območjem potrebno zožiti. In sicer, v primerih, kjer je to potrebno, naj bi bil ta zožen na 90.00% - 111.11%. Kadar ima C_{max} velik pomen za varnost, učinkovitost in z vidika spremljanja koncentracij učinkovine, pa naj bi se po priporočilih EMA sprejemljivi interval 90.00% - 111.11% uporabil tudi za ta parameter (1). Nasprotno pa FDA bioekvivalenčna smernica (6) priporoča, da BE limita 80% - 125%, ki velja za učinkovine, ki nimajo ozkega terapevtskega območja, ostane nespremenjena tudi za mere biološke

uporabnosti (AUC in C_{max}) učinkovin z ozkim terapevtskim območjem, razen če ni drugače določeno s posebno smernico. Kakorkoli pa FDA bioekvivalenčna smernica (6) priporoča, da sponzorji razmislijo o dodatnem testiranju in/ali nadzoru za zagotavljanje kakovosti zdravil, ki vsebujejo učinkovine z ozkim terapevtskim območjem.

FDA smernica opredeljuje zdravila z ozkim terapevtskim območjem tista, ki vsebujejo določene učinkovine, ki so predmet spremljanja terapevtskih koncentracij učinkovine ali farmakodinamičnega spremljanja in/ali kjer navodila o uporabi referenčnega zdravila kažejo na ozko terapevtsko območje. FDA primeri učinkovin z ozkim terapevtskim območjem vključujejo digoksin, litij, fenitoin, teofilin in varfarin (6).

Podobno tudi po mnenju EMA določitev skupka kriterijev za kategorizacijo učinkovin kot tiste z ozkim terapevtskim območjem ni mogoča, ampak se je potrebno odločiti na osnovi kliničnih vidikov, ali učinkovina spada med učinkovine z ozkim terapevtskim območjem (1).

Iz zgoraj navedenega je razvidno, da je določitev, ali se lahko učinkovina obravnava kot tista z ozkim terapevtskim območjem ali ne, tako pri FDA kot pri EMA, potrebna od primera do primera. Prav tako naj bi bila potreba po zožitvi sprejemljivega intervala tako za AUC in C_{max} ali le za AUC po priporočilih EMA določena od primera do primera (6, 1).

Učinkovine z ozkim terapevtskim območjem niso uporabne za opustitev bioekvivalenčnih študij, osnovanih na BCS (1, 8) (glej točko 15).

13. Učinkovine oz. zdravila z visoko variabilnostjo

Podobno kot pri učinkovinah z ozkim terapevtskim območjem (glej točko 12) tudi pri visoko variabilnih učinkovinah FDA vztraja pri tradicionalnem BE kriteriju (tj. 80% – 125%). Za razliko o FDA pa EMA pri zdravilih z visoko variabilnostjo (tj. tistih, pri katerih je intra-subjektna variabilnost parametra večja od 30%), za katere se na osnovi tehtne klinične utemeljitve predvideva, da je širša razlika v C_{max} klinično nepomembna, dopušča možnost razširitve sprejemljivih mej za C_{max} . V tem primeru so lahko sprejemljive meje razširjene do največ 69.84% – 143.19%. Razlike med omenjenima regulatornima agencijama v bioekvivalenčnih zahtevah pri učinkovinah z visoko variabilnostjo so prikazane v Preglednici 9.

Preglednica 9. Razlike v BE zahtevah pri učinkovinah z visoko variabilnostjo med FDA in EMA.

FK parameter	EMA	FDA
AUC	tradicionalne BE meje 80.00% – 125.00%	tradicionalne BE meje
C_{max}	širši interval do največ 69.84% – 143.19% je lahko sprejemljiv	80.00% – 125.00%

Za sprejem razširjenega intervala naj bi bila BE študija po priporočilih EMA študija s ponovljenim načrtom (bodisi s 3 ali 4 periodami), v kateri je dokazano, da je znotraj-subjektna variabilnost za C_{max} referenčne formulacije >30%. Poleg tega naj bi vlagatelj

utemeljil, da je izračunana intra-subjektne variabilnost zanesljiva ocena in ne rezultat osamelcev. Prošnja za razširjeni interval naj bi bila vnaprej določena v protokolu študije.

Po priporočilih EMA naj bi obseg širitve temeljil na osnovi znotrajsubjektne variabilnosti, opažene v študiji, z uporabo skalirane povprečne bioekvivalence v skladu z $[U, L] = \exp[\pm k \cdot s_{WR}]$, kjer je U je zgornja meja sprejemljivega območja, L spodnja meja sprejemljivega območja, k regulatorna konstanta (0.760) in s_{WR} znotrajsubjektne standardna deviacija logaritemsko transformiranih vrednosti C_{max} referenčnega zdravila. Spodnja preglednica prikazuje primere, kako različne stopnje variabilnosti z uporabo te metode dajejo različne sprejemljive meje.

Poleg tega EMA priporoča, da naj bi razmerje geometrijskih sredin ležalo v območju običajnih mej sprejemljivosti 80.00% - 125.00%.

Preglednica 10. Primeri sprejemljivih mej za različne stopnje intrasubjektne variabilnosti, določene z uporabo metode skalirane povprečne bioekvivalence.

CV za intrasubjektno variabilnost*	Spodnja meja	Zgornja meja
30	80.00	125.00
35	77.23	129.48
40	74.62	134.02
45	72.15	138.59
≥50	69.84	143.19

$$* CV(\%) = 100 \cdot \sqrt{e^{s_{WR}^2} - 1}$$

Kakorkoli, možnost za razširitev sprejemljivih mej, ki temeljijo na osnovi visoke znotraj-subjektne variabilnosti, ne velja za AUC, pri katerem po priporočilih EMA sprejemljivo območje ostaja 80.00% - 125.00%, ne glede na variabilnost (1).

14. Zahteve za bioekvivalenčne študije za različne farmacevtske oblike

Kadar testno zdravilo vsebuje različno sol, ester, eter, izomer, mešanico izomer, kompleks ali derivat učinkovine od referenčnega zdravila, naj bi bila po priporočilih EMA in FDA bioekvivalenca dokazana v *in vivo* bioekvivalenčni študiji. Kakorkoli, kadar je učinkovina v testnem in referenčnem zdravilu identična, bioekvivalenčne študije v nekaterih primerih niso potrebne, kot je to opisano v nadaljevanju in poglavju 15. Po priporočilih EMA je slednje lahko sprejemljivo tudi v primeru, kadar testno in referenčno zdravilo vsebujeta različno sol, pod pogojem, da obe pripadata BCS razredu I (1).

Odvisno od vrste formulacije obstajajo različne zahteve za bioekvivalenčne študije, kot je opisano v nadaljevanju (1).

14.1. Peroralne raztopine

Po priporočilih EMA bioekvivalenčna študija ni potrebna, kadar:

- je testno zdravilo v času aplikacije vodna peroralna raztopina in
- vsebuje učinkovino v enaki koncentraciji kot odobrena peroralna raztopina.

Kakorkoli, če pomožne snovi, ki jih vsebuje, lahko vplivajo na gastrointestinalni prehod (npr. sorbitol, manitol, itd.), absorpcijo (npr. površinsko aktivne snovi ali pomožne snovi, ki lahko vplivajo na prenašalne proteine), *in vivo* topnost (npr. sotopila) ali *in vivo* stabilnost učinkovine, je po mnenju EMA bioekvivalenčna študija potrebna, razen če so lahko razlike v količinah teh pomožnih snovi ustrezno utemeljene s sklicevanjem na druge podatke. Za podobnost pomožnih snovi peroralnih raztopin veljajo enake zahteve kot pri pristopu opustitve bioekvivalenčnih študij (glej točko 15.2.2) (1).

FDA je glede izvajanja bioekvivalenčnih študij pri omenjenih farmacevtskih oblikah manj stroga. In sicer, se v splošnem *in vivo* BE študije za raztopine ne izvajajo na osnovi predpostavke, da je sproščanje učinkovine iz farmacevtske oblike samoumevno, če:

- peroralna raztopina vsebuje učinkovino v enaki koncentraciji in farmacevtski obliki kot odobreno zdravilo (18) in
- ne vsebuje pomožnih snovi, ki lahko pomembno vplivajo na absorpcijo učinkovine ali aktivnega dela učinkovine (18, 6). Kakorkoli, podobno kot EMA tudi FDA opozarja, da obstajajo nekatere pomožne snovi, kot sta sorbitol in manitol, ki lahko zmanjšajo biološko uporabnost učinkovin z nizko intestinalno permeabilnostjo v količinah, ki se včasih uporabljajo v peroralnih tekočih farmacevtskih oblikah (6, 18).

14.2. Parenteralne raztopine

Nasprotno pa ima v primeru parenteralnih raztopin FDA strožje zahteve za izvajanje bioekvivalenčnih študij v primerjavi z EMA. Namreč, medtem ko EMA v določenih primerih dovoljuje odstopanje v kvalitativni in/ali kvantitativni sestavi pomožnih snovi, pa po priporočilih FDA bioekvivalenčne študije niso potrebne zgolj v primeru, da testna formulacija vsebuje pomožne snovi v enaki koncentraciji kot referenčno zdravilo (1).

In sicer, po priporočilih EMA bioekvivalenčne študije v splošnem niso potrebne, kadar je tesno zdravilo aplicirano v obliki vodne intravenske raztopine, ki vsebuje enako učinkovino kot trenutno odobreno zdravilo. Vendar, če katerakoli pomožna snov interagira z učinkovino (npr. nastanek kompleksa) ali drugače vpliva na razporeditev učinkovine, je po mnenju EMA bioekvivalenčna študija potrebna, razen če obe zdravili ne vsebujeta enakih pomožnih snovi v zelo podobni količini in se lahko ustrezno utemelji, da razlika v količini ne vpliva na farmakokinetiko učinkovine.

V primeru drugih parenteralni poti (npr. intramuskularne ali subkutane) bioekvivalenčne študije niso potrebne, kadar:

- je tip raztopine testnega zdravila enak (tj. vodna ali oljna raztopina),
- vsebuje enako koncentracijo enake učinkovine in
- enake pomožne snovi v podobnih količinah kot trenutno odobreno zdravilo (1).

Poleg tega bioekvivalenčna študija ni potrebna tudi v primeru vodnih parenteralnih raztopin s primerljivimi pomožnimi snovi v podobnih količinah, če se lahko dokaže, da pomožne snovi nimajo nobenega vpliva na viskoznost (1).

Po priporočilih FDA pa pri parenteralnih raztopinah, namenjenih za injiciranje, bioekvivalenčne študije niso potrebne pod pogojem, da vsebujejo enako učinkovino in pomožne snovi v enaki koncentraciji kot referenčno zdravilo (18).

V bioekvivalenčni smernici EMA za farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem (1) najdemo zahteve za bioekvivalenčne študije tudi za liposomalne, micelarne in emulzijske farmacevtske oblike za intravensko uporabo.

- **Liposomalne formulacije:**

Farmakokinetične vprašanja povezana z liposomalnimi formulacijami za i.v. aplikacijo zahtevajo posebne premisleke, ki v omenjeni smernici niso zajeti.

- **Emulzije:**

Po priporočilih EMA emulzije običajno ne izpolnjujejo pogojev za opustitev bioekvivalenčne študije. Vendar pa je lahko emulzija upravičena za opustitev bioekvivalenčne študije kadar:

- zdravilo ni načrtovano za nadzorovano sproščanje ali dispozicijo,
- metoda in hitrost aplikacije sta enaki kot pri trenutno odobrenem zdravilu.

V teh primerih naj bi bila sestava kvalitativno in kvantitativno enaka kot pri trenutno odobreni emulziji. Poleg tega je potrebno predložiti zadovoljive podatke, ki dokazujejo, da so fizikalno-kemijske lastnosti zelo podobne, vključno z distribucijo velikosti dispergirane lipidne faze in le-te podpreti z ostalimi relevantnimi lastnostmi emulzij, npr. površinskimi lastnostmi kot so Zeta potencial in reološke lastnosti.

- **Lipidi za intravensko parenteralno prehrano** se po priporočilih EMA lahko upravičeni za opustitev bioekvivalenčne študije, kadar so zagotovljeni zadovoljivi podatki, ki dokazujejo primerljive fizikalno-kemijske lastnosti. Razlike v sestavi so lahko upravičene ob upoštevanju narave in terapevtskega namena teh farmacevtskih oblik.

- **Formulacije, ki tvorijo micle**

Micelarne raztopine za i.v. aplikacijo je potrebno obravnavati kot 'kompleksne' raztopine in zato običajno ne izpolnjujejo pogojev za opustitev bioekvivalenčne študije.

Vendar pa so lahko micelarne formulacije upravičene za opustitev bioekvivalenčne študije kadar:

- pri redčenju pride do hitrega razdruževanja micelov in zdravilo ni načrtovano za nadzorovano sproščanje ali dispozicijo;
- metoda in hitrost aplikacije sta enaki kot pri trenutno odobrenem zdravilu;
- pomožne snovi ne vplivajo na dispozicijo učinkovine.

V teh primerih naj bi bila sestava micelarne infuzije tik pred aplikacijo kvalitativno in kvantitativno enaka tisti kot pri trenutno odobrenem zdravilu. Poleg tega je po priporočilih EMA potrebno predstaviti zadovoljive podatke, ki dokazujejo podobne fizikalno-kemijske lastnosti. Na primer, kritično micelarno koncentracijo, sposobnost solubilizacije formulacije (kot je največja dodana koncentracija), prosto in vezano učinkovino in micelarno velikost.

To velja tudi v primeru manjših sprememb v kvalitativni in kvantitativni sestavi, pod pogojem, da te ne vključujejo sprememb v količini ali vrste površinsko aktivnih snovi (1).

14.3. Lokalno delujoča zdravila za lokalno uporabo

Za zdravila za lokalno uporabo (po oralni, nazalni, pulmonalni, okularni, dermalni, rektalni, vaginalni aplikaciji, itd.), ki so namenjena za delovanje na mestu aplikacije, so priporočila v drugih smernicah (CPMP/EWP/4151/00 rev 1, CPMP/EWP/239/95).

V primeru raztopin kot so kapljice za oči, nazalna pršila ali raztopine za aplikacijo na koži je po priporočilih EMA opustitev bioekvivalenčne študije lahko sprejemljiva kadar:

- ima testno zdravilo isti tip raztopine (tj. vodna ali oljna raztopina) in
- vsebuje enako koncentracijo enake učinkovine kot trenutno odobreno zdravilo.

Manjše razlike v sestavi pomožnih snovi so lahko sprejemljive, kadar so ustrezne farmacevtske lastnosti testnega zdravila in referenčnega zdravila identične ali bistveno podobne. Kakšnekoli kvalitativne ali kvantitativne razlike v pomožnih snoveh pa morajo biti ustrezno utemeljene z vidika njihovega vpliva na terapevtsko ekvivalenco. Metoda in način aplikacije naj bi bil pravtako enaki kot pri trenutno odobrenem zdravilu, razen če ni drugače utemeljeno (1).

Kadarkoli lokalna uporaba rezultira v sistemski izpostavljenosti, lokalno delujoče zdravilo predstavlja tveganje za sistemske neželene učinke. Zato je po mnenju EMA potrebno dokazati, da sistemska izpostavljenost testnega zdravila ni višja od tiste referenčnega zdravila (tj. zgornja meja 90% intervala zaupanja naj ne bi presegla zgornje bioekvivalenčne sprejemljive meje 125.00%) (1).

Priporočila FDA za zgoraj navedena lokalno delujoča zdravila za lokalno uporabo so nekoliko podrobneje razdelana glede na lokalno uporabo. In sicer, za peroralno aplicirane učinkovine, namenjene lokalnemu delovanju, se lahko po mnenju FDA podobno kot po mnenju EMA podobnost dokaže z uporabo študij BE s končnimi točkami klinične učinkovitosti in varnosti. Kot dopolnilo slednjim ali celo alternativo pa FDA navaja tudi ustrezno načrtovane in izvedene *in vitro* študije, če le-te bodisi odražajo pomembne klinične učinke ali so bolj občutljive na spremembe v učinkovitosti zdravila v primerjavi s klinično študijo (6).

Za raztopine za oči (kot tudi za ušesa) se lahko podobno kot pri EMA tudi pri FDA študija ne izvede pod pogojem, da raztopina vsebuje enako učinkovino in pomožne snovi v enakih koncentracijah kot trenutno odobreno zdravilo (18).

Po priporočilih FDA študija ni potrebna tudi v primeru raztopin za aplikacijo na koži, raztopin za aerosolizacijo ali nebulizacijo, nazalnih raztopin in drugih podobnih raztopin, kadar:

- je učinkovina v enaki koncentraciji in farmacevtski obliki kot že odobreno zdravilo in
- ne vsebuje nobenih drugih pomožnih snovi ali sprememb v formulaciji v primerjavi z referenčnim zdravilom, ki lahko signifikantno vplivajo na sistemsko ali lokalno razpoložljivost zdravil, namenjenih za lokalno delovanje (18).

14.4. Suspenzije

Obe obravnavani regulatorni agenciji za omenjene farmacevtske oblike kot peroralno aplicirane farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem in sistemskim delovanjem v splošnem priporočata izvedbo bioekvivalenčnih študij (1, 6), razen v primerih, kjer se lahko bioekvivalenčna študija opusti (glej točko 15) (1).

14.5. Plini

Za pline za inhaliranje po priporočilih EMA in FDA bioekvivalenčne študije niso potrebne (1, 18).

14.6. Ne-peroralne farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem s sistemskim delovanjem

Ta odstavek se nanaša na npr. rektalne formulacije. Po priporočilih EMA so bioekvivalenčne študije pri omenjenih farmacevtskih oblikah potrebne. O opustitvi bioekvivalenčne študije se lahko premisli v primeru raztopin, ki vsebujejo učinkovino v enaki koncentraciji kot odobrena raztopina in z enako kvalitativno in podobno kvantitativno sestavo pomožnih snovi (v tem primeru veljajo enaki pogoji, kot so navedeni pri peroralnih raztopinah) (1).

V seminarju obravnavanih smernicah FDA za omenjene farmacevtske oblike ni posebnih priporočil glede zahtev za bioekvivalenčnih študije.

14.7. Oralne farmacevtske oblike

14.7.1. Orod disperzibilne tablete (ODT)

Za orod disperzibilne tablete naj bi se uporabljala specifična priporočila EMA, opisana v nadaljevanju. Kot že omenjeno, FDA za le-te ne daje specifičnih priporočil.

Orod disperzibilne tablete so oblikovane tako, da se v ustih hitro razpustijo. Namestitev v usta in čas stika sta lahko kritična v primerih, kadar se učinkovina raztaplja v ustih in se lahko absorbira neposredno preko bukalne mukoze. Odvisno od požiranja formulacije (npr. obložene učinkovine) lahko pride do naknadne absorpcije iz prebavnega trakta. Kadar se lahko dokaže, da se učinkovina v ustni votlini ne absorbira, ampak se absorbira šele iz gastrointestinalnega trakta potem, ko jo pogoltnemo, je možna opustitev bioekvivalenčne študije osnovana na BCS. Kadar to ni mogoče dokazati, je potrebna *in vivo* bioekvivalenčna študija (1).

Za generično ODT zdravilo že odobrenemu referenčnemu ODT zdravilu veljajo naslednja priporočila v zvezi z načrtom študije:

- Če se lahko referenčno zdravilo jemlje z ali brez vode, je potrebno bioekvivalenco dokazati brez vode, saj je ta pogoj najbolj podoben nameravani uporabi formulacije. To je še posebej pomembno, če se učinkovina lahko raztopi in delno absorbira že v ustni votlini. Če je bioekvivalenca dokazana, ko je zdravilo vzeto brez vode, lahko sklepamo na bioekvivalenco, ko je zdravilo vzeto z vodo.
- Če se referenčno zdravilo jemlje na en sam način (npr. samo z vodo), naj bi bila bioekvivalenca dokazana pod tem pogojem (z običajnim načrtom študije z dvema periodama in dvema sekvencama).
- Če se referenčno zdravilo jemlje na en sam način (npr. samo z vodo) in generik zaprosi za dodatne načine aplikacije (npr. brez vode), je potrebno konvencionalen in nov način aplikacije tesnega zdravila primerjati z referenčnim zdravilom, apliciranim po konvencionalnem načinu (načrt študije s 3 zdravljenji, 3 periodami in 6 sekvencami).

V študijah vrednotenja ODT brez vode EMA priporoča, da se prostovoljcu zmočijo usta (tako da naredi požirek 20 ml vode) tik preden se na jezik položi ODT. Dalje je priporočljivo, da 1 ure pred aplikacijo vnos tekočin ni dovoljen (1).

14.7.2. Bukalne in sublingulane farmacevtske oblike ter žvečljive tablete

Za bioekvivalenčne študije ostalih oralnih farmacevtskih oblik pa najdemo priporočila tako pri EMA kot tudi FDA.

In sicer, po priporočilu EMA se lahko ostale oralne formulacije kot so orodisperzibilni filmi, bukalne tablete ali filmi, sublingualne tablete in žvečljive tablete obravnavajo na podoben način kot orodisperzibilne tablete. Dalje EMA za omenjene farmacevtske oblike priporoča, da naj bi bile bioekvivalenčne študije izvedene skladno s priporočeno uporabo zdravila (1).

FDA bioekvivalenčna smernica (6) pa za farmacevtske oblike s hitrim sproščanjem, kot so bukalne in sublingulane farmacevtske oblike in žvečljive tablete, priporoča preizkus *in vitro* sproščanja in *in vivo* bioekvivalence. Za žvečljive tablete dodatno priporoča, da se le-te kot celota izpostavijo *in vitro* testiranju sproščanja, saj jih bolniki lahko pogoltnejo brez ustreznega žvečenja. Na splošno naj bi bili *in vitro* pogoji testiranja sproščanja za žvečljive tablete enaki kot za nežvečljive tablete enake učinkovine ali aktivnega dela učinkovine. Redko so lahko za žvečljive in nežvečljive tablete potrebni različni pogoji testiranja ali kriteriji sprejemljivosti (6). EMA posebnih priporočil glede *in vitro* testiranja žvečljivih tablet ne navaja (1).

14.8. Sistemi za transdermalno dostavo učinkovin

V primeru omenjenih farmacevtskih oblik EMA priporoča upoštevanje naslednjih postavk:

- Bioekvivalenca sistemov za transdermalno dostavo učinkovin v primerjavi z inovatorjevim zdravilom naj bi se običajno ocenila po enkratni aplikaciji odmerka, kot tudi po večkratni aplikaciji odmerka.

- Mesto aplikacije v bioekvivalenčni študiji naj bi bilo tako za testno kot referenčno zdravilo na istem mestu.
- V primeru večih jakosti, se lahko bioekvivalenčna študija izvede na največji jakosti, če so izpolnjeni naslednji pogoji:
 - eksaktna proporcionalnost v formulaciji (tj. sestava je enaka); jakost je proporcionalna efektivni površini obliža in nižje jakosti so lahko obravnavane kot »delne« površine višjih jakosti;
 - obstaja sprejemljiv *in vitro* test sproščanja.
- Ker so obliži pogosto visoko variabilna zdravila, je priporočljiva izvedba študije s ponovljenim načrtom. Slednja je potrebna tudi, kadar se primerjajo sistemi za transdermalno dostavo učinkovin z različnimi mehanizmi sproščanja (rezervoar vs. matriks).
- Za testno zdravilo naj bi se dokazala enaka ali manjša stopnja lokalnega draženja, adhezivnosti na kožo, fototoksičnosti, preobčutljivosti in podoben profil neželenih učinkov v primerjavi z referenčnim zdravilom (2).

Tudi za bioekvivalenčne študije teh farmacevtskih oblik v obravnavanih smernicah FDA ni posebnih priporočil.

14.9. Farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem za intramuskularno ali subkutano aplikacijo

Za suspenzije, komplekse ali kakršnikoli matrikse namenjene za zakasnitev ali podaljšanje sproščanja učinkovine za i.m. ali s.c. aplikacijo naj bi po priporočilih EMA dokaz bioekvivalence sledil priporočilom za ekstravaskularne farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem, npr. transdermalne farmacevtske oblike (glej točko 14.9).

14.10. Zdravila s fiksnimi kombinacijami učinkovin

Po priporočilih EMA so pri omenjenih farmacevtskih oblikah bioekvivalenčne študije potrebne (4). Odvisno od formulacije naj bi farmakokinetična bioekvivalenca sledila bioekvivalenčni smernici za farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem oz. tisti za farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem. Opustitev bioekvivalenčne študije na osnovi BCS je po mnenju EMA primeren za farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem kadar so vse posamezne komponente fiksne kombinacije primerne (4).

Kadar vloga zajema več jakosti, je lahko sprejemljiv dokaz bioekvivalence le na eni jakosti. In sicer se lahko opustitev bioekvivalenčne študije za dodatno jakost uporablja, kadar so za vse posamezne učinkovine izpolnjeni vsi pogoji, opisani v odstavku 8.1 (4).

Kadar SmPC priporoča jemanje vsake od komponent v stanju na tešče ali s hrano, zadostuje bioekvivalenčna študija izvedena pod pogojem, ki ga priporoča SmPC. Kakorkoli, za farmacevtske oblike s fiksnimi kombinacijami učinkovin s prirejenim sproščanjem pa so potrebne primerjalne študije v stanju na tešče in s hrano (4).

15. Opustitev bioekvivalenčne študije osnovana na BCS

Biofarmaceutski klasifikacijski sistem (BCS) je znanstveni okvir za razvrščanje učinkovin na osnovi njihove topnosti v vodi in intestinalne permeabilnosti. V kombinaciji s sproščanjem učinkovine iz farmacevtske oblike, biofarmaceutski klasifikacijski sistem upošteva tri glavne dejavnike, ki vplivajo na hitrost in obseg absorpcije učinkovine iz trdnih peroralnih farmacevtskih oblik s takojšnjim sproščanjem: sproščanje, topnost in intestinalno permeabilnost.

Po biofarmaceutskem klasifikacijskem sistemu so učinkovine razvrščene v štiri razrede (Preglednica 11).

Preglednica 11. Razvrstitev učinkovin po biofarmaceutskem klacifikacijskem sistemu.

BCS razred	Topnost	Permeabilnost
I	visoka	visoka
II	nizka	visoka
III	visoka	nizka
IV	nizka	nizka

Poleg tega lahko trdne peroralne farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem razvrstimo na tiste s hitrim ali počasnim sproščanjem (8).

V tem okviru, kadar so izpolnjeni določeni kriteriji, se lahko biofarmaceutski klasifikacijski sistem uporablja kot orodje v razvoju zdravila za pomoč sponzorjem pri utemeljevanju prošenj za opustitev bioekvivalenčnih študij (8). Pristop opustitve bioekvivalenčnih študij, ki temelji na BCS, je namenjen zmanjšanju *in vivo* bioekvivalenčnih študij (tj. lahko predstavlja nadomestek za *in vivo* bioekvivalenco). *In vivo* bioekvivalenčne študije so lahko oproščene, kadar lahko ekvivalenco v *in vivo* obnašanju zagovarjamo z zadovoljivimi *in vitro* podatki (1).

Pristop opustitve bioekvivalenčnih študij, ki temelji na BCS, se lahko po priporočilih FDA in EMA uporablja za farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem kadar:

- je bilo dokazano, da učinkovina izkazuje visoko topnost in popolno absorpcijo (EMA) oz. visoko permeabilnost (FDA) (BCS razred I, za podrobnosti glej točko 15.1.1) in
- je *in vitro* sproščanje testne in referenčne formulacije zelo hitro (>85% v 15 min po priporočilih EMA oz. >85% v 30 min po priporočilih FDA) ali le v primeru EMA podobno hitro (85% znotraj 30 min) ob upoštevanju določenih zahtev (glej točko 15.2.1) in
- ni verjetno, da bi pomožne snovi imele kakršenkoli pomemben vpliv na absorpcijo učinkovin po priporočilih FDA oz. pomožne snovi, ki lahko vplivajo na biološko uporabnost so kvalitativno in kvantitativno enake po priporočilih EMA, v splošnem pa EMA priporoča uporabo enakih pomožnih snovi v enakih količinah (glejte točko 15.2.2).

FDA poleg zgoraj navedenih pogojev zahteva dokaz podobnosti profilov sproščanja med testnim in referenčnim zdravilom. Izbira aparature za sproščanje (USP aparatura I ali II) naj bi bila enaka kot tista, določena za referenčno zdravilo (8, 1).

EMA poleg zgoraj omenjenega pristopa opustitve bioekvivalenčnih študij za farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem, ki vsebujejo učinkovine BCS razreda I, dodaja še pristop opustitve bioekvivalenčnih študij za učinkovine BCS razreda III. Slednji je priporočil EMA sprejemljiv, če:

- je bilo dokazano, da učinkovina izkazuje visoko topnost in omejeno absorpcijo (BCS razred III, za podrobnosti glej točko 15.1.1) in
- je bilo dokazano zelo hitro (> 85% v 15 min) *in vitro* sproščanje testne in referenčne formulacije ob upoštevanju določenih zahtev (glej točko 15.2.1) in
- pomožne snovi, ki lahko vplivajo na biološko uporabnost so kvalitativno in kvantitativno enake, ostale pomožne snovi pa so kvalitativno enake in kvantitativno zelo podobne (glej točko 15.2.2) (1).

Uporabo pristopa opustitve bioekvivalenčnih študij osnovanega na BCS obe regulatorni agenciji omejujeta na učinkovine, ki veljajo za nekritične v smislu terapevtskega območja (1). Torej, pristop opustitve bioekvivalenčnih študij osnovan na BCS ni uporaben za učinkovine z ozkim terapevtskim območjem (8). Poleg tega je koncept uporaben za farmacevtsko ekvivalentne trdne farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem za peroralno aplikacijo in sistemskim delovanjem. Ne velja pa za zdravila, namenjena absorpciji v ustni votlini (8), kot so podjezične in bukalne farmacevtske oblike (1, 8). Za orodisperzibilne tablete pa je lahko po priporočilih EMA pristop opustitve bioekvivalenčnih študij na osnovi BCS uporabljen, kadar je lahko absorpcija v ustni votlini izključena. Za razliko od EMA pa FDA v obravnavanih smernicah za omenjene farmacevtske oblike ne daje posebnih priporočil (1).

Po definiciji obeh regulatornih agencij sta zdravili farmacevtska ekvivalentna, kadar vsebujeta enako količino enake učinkovine (tj., enaka kemijska oblika) v enaki farmacevtski obliki (E5; Drugs@FDA - Glossary of Terms). Pristop opustitve bioekvivalenčnih študij se torej lahko uporablja, kadar sta učinkovini v testnem in referenčnem zdravilu enaki. Kakorkoli, EMA v primeru opustitve bioekvivalenčnih študij za učinkovine BCS razreda 1 dovoljuje uporabo različnih soli. Pristop opustitve bioekvivalenčnih študij pa ni uporaben, kadar testno zdravilo vsebuje drug ester, eter, izomer, zmes izomerov, kompleks ali derivat učinkovine kot referenčno zdravilo, ker te razlike lahko vodijo do različnih bioloških uporabnosti, o katerih iz poskusov, uporabljenih v konceptu opustitve bioekvivalenčnih študij osnovanem na BCS, ne moremo sklepati (1).

15.1. Učinkovina

15.1.1. Topnost

Tako EMA kot tudi FDA zahtevata določitev profila topnosti učinkovine v odvisnosti od pH. Kakorkoli pa se kriteriji, po katerih učinkovina velja za visoko topno, med omenjenima regulatornima agencijama nekoliko razlikujejo (1, 8).

Po EMA BE smernici (1) učinkovina velja za dobro topno, kadar se največji enkratni odmerek apliciran v obliki formulacije s takojšnjim sproščanjem popolnoma raztopi v 250 ml pufra v območju pH 1 – 6.8 pri $37\pm 1^\circ\text{C}$. Po priporočilih FDA pa je učinkovina dobro topna, ko je najvišja jakost farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem topna v 250 ml ali manj vodnega medija v pH območju 1-7.5 pri $37\pm 1^\circ\text{C}$ (6). Volumen 250 ml izhaja iz protokola tipične BE študije, ki določa aplikacijo zdravila teščim prostovoljcem s kozarcem vode (pribl. 8 unčev, tj. pribl. 240ml) (8).

Ključna razlika je torej v meji razreda topnosti, ki v primeru EMA temelji na najvišjem enkratnem odmerku, medtem ko je v primeru FDA osnovan na najvišji jakosti. Kar pomeni, da je pri opredeljevanju dobro topnih učinkovin zdravil, pri katerih je najvišji enkratni odmerek večji od najvišje jakosti, EMA strožja. Druga razlika je v fiziološkem pH območju, ki je širši v primeru FDA.

Za natančno opredelitev pH-topnostnega profila je potrebno ovrednotiti zadostno število pH pogojev (8). In sicer, EMA priporoča ovrednotenje topnosti v najmanj treh pufrih znotraj pH območja 1 – 6.8 (po možnosti v pH 1.2, 4.5 in 6.8) ter v pKa, če je le-ta znotraj omenjenega območja (1). V primeru FDA pa naj bi število pH pogojev za določitev topnosti temeljilo na ionizacijskih lastnostih testne učinkovine. Na primer, če je pKa učinkovine v območju 3-5, naj bi bila topnost določena pri $\text{pH} = \text{pKa}$, $\text{pH} = \text{pKa} + 1$, $\text{pH} = \text{pKa} - 1$ in pri $\text{pH} = 1$ in 7.5. Obe regulatorni agenciji priporočata preveritev pH raztopine po dodatku učinkovine v pufer.

Tako EMA kot tudi FDA priporočata več ponovitev pri vsakem pH pogoju (8, 1). In sicer, po priporočilih FDA naj bi bilo le-teh najmanj tri, odvisno od variabilnosti študije pa FDA priporoča še dodatno ponovitev za zagotovitev zanesljive ocene topnosti (8).

Metoda, priporočena za določanje topnosti s strani obeh regulatornih agencij je tradicionalna metoda stresanja bučke. Druge metode (npr. metoda titracije s kislino ali bazo (8)) se lahko uporabijo v primeru, kadar se utemelji, da so le-te zmožne napovedovati ravnotežno topnost preiskovane učinkovine (8, 1).

15.1.2. Permeabilnost oz. absorpcija

Po EMA BE smernici (1) ima učinkovina popolno absorpcijo, ki je običajno povezana z visoko permeabilnostjo, kadar je obseg absorpcije pri ljudeh $\geq 85\%$. Po priporočilih FDA je odstotek, pri katerem učinkovina velja za visoko permeabilno, nekoliko višji, tj. $\geq 90\%$ apliciranega odmerka. Poleg tega FDA pri visoko permeabilnih učinkovinah zahteva dokaz, da učinkovina ni nestabilna v gastrointestinalnem traktu (tj. dokaz, da je izguba učinkovine iz GIT posledica prehajanja intestinalne membrane in ne procesa razgradnje) (8). Stabilnost v GIT se lahko dokaže z uporabo želodčnih ali intestinalnih tekočin, pridobljenih na ljudeh. Namesto teh se lahko uporabijo tudi gastrointestinalne tekočine iz ustreznih živalskih modelov in/ali simulirane tekočine, kot sta umetni želodčni sok in umetni črevesni sok po USP. Raztopine učinkovine v teh tekočinah je potrebno inkubirati pri 37°C za obdobje, ki predstavlja *in vivo* stik učinkovine s temi tekočinami, na primer 1 uro v želodčni tekočini in 3 ure v intestinalni tekočini. Koncentracije učinkovine je potrebno nato določiti z uporabo validiranih analiznih metod. Signifikantna razgradnje ($>5\%$) učinkovine lahko kaže na morebitno nestabilnost. Pridobitev intestinalne tekočine od ljudi zahteva intubacijo in je lahko v nekaterih primerih težavno.

Permeabilnostni razred učinkovine naj bi se po priporočilih EMA in FDA določil pri ljudeh z uporabo pristopov masne bilance ter absolutne biološke uporabnosti (1, 8). FDA poleg farmakokinetičnih študij pri ljudeh predlaga tudi uporabo pristopov intestinalne perfuzije, in sicer *in vivo* študije intestinalne permeabilnosti na ljudeh, *in vivo* ali *in situ* intestinalne perfuzije na ustreznem živalskem modelu (npr. podganah) in/ali *in vitro* metode permeabilnosti, ki uporabljajo izrezana intestinalna tkiva ali monosloje primernih epitelijskih celic (8). Po priporočilih FDA lahko zadostuje ena sama metoda (npr. ko je absolutna BU 90% ali ko se 90% ali več aplicirane učinkovine izloči v urin). Ko z eno samo metodo ne moremo dokončno določiti permeabilnostnega razreda, se priporočata dve različni metodi (8). Za dodatno podporo razvrstitve FDA priporoča uporabo informacij o kemični strukturi in/ali določenih fizikalno-kemijskih lastnostih učinkovine (npr. porazdelitveni koeficient v ustreznem sistemu), ki lahko dajejo koristne informacije o permeabilnostnih lastnostih učinkovine. EMA kot možno podporo omenjenim *in vivo* podatkom iz študij masne bilance in absolutne BU na ljudeh predlaga dokaz bioekvivalence med vodno in trdno formulacijo, apliciranima peroralno ter *in vitro* študije permeabilnosti. Slednje se v primeru FDA lahko uporabilo ne le kot podpora, temveč za določanje razreda permeabilnosti (8, 1).

Podatki iz študij masne bilance za določitev razreda permeabilnosti so po mnenju EMA sprejemljivi le, kadar se v urin v obliki prvotne učinkovine, oksidativnih metabolitov faze 1 in konjugativnih metabolitov faze 2 izloči $\geq 85\%$ odmerka (1).

In vivo ali *in situ* živalski modeli in *in vitro* metode, kot so tiste, ki uporabljajo kultivirane monosloje živalskih ali človeških epitelijskih celic, pa FDA (8) šteje kot ustrezne za učinkovine, ki prehajajo GI membrano pasivno. Namreč, opažena nizka permeabilnost nekaterih učinkovin pri človeku je lahko posledica efluksa učinkovine preko membranskih prenašalcev kot je P-glikoprotein (P-gp). Kadar efluksnih prenašalcev v teh modelih ni ali je njihova stopnja ekspresije nizka v primerjavi s tisto pri človeku, obstaja za učinkovine, ki so izpostavljene efluksu velika verjetnost za napačno razvrstitev v permeabilnostni razred v primerjavi z učinkovinami, ki prehajajo pasivno. Ekspresijo znanih prenašalcev v študiji je potrebno okarakterizirati.

15.2. Formulacija

15.2.1. *In vitro* sproščanje

15.2.1.1. Določanje lastnosti *in vitro* sproščanja

In vitro študije sproščanja naj bi potrjevale lastnosti takojšnjega sproščanja in dokazovale podobnost med zdravili, ki jih preučujemo, to je podobno *in vitro* sproščanje testne in referenčne formulacije ob upoštevanju fiziološko pomembnih eksperimentalnih pH pogojev (1).

Po priporočilih obeh regulatornih agencij naj bi se testiranje sproščanja izvajalo v USP aparaturi I (aparatura s košarico) pri 100 obr./min ali USP aparaturi II (aparatura z veslastim mešalom) pri 50 obr./min z uporabo naslednjih pH pogojev: pH 1.2 (0.1N HCl ali

umetni želodčni sok brez encimov), pH 4.5 (pufer pH 4.5) in pH 6.8 (pufer s pH 6.8 ali umetni črevesni sok brez encimov) (1, 8), pri čemer EMA priporoča uporabo Ph.Eur. pufrov, FDA pa USP pufre (1, 8). EMA v primeru prvega pufrja dopušča nekoliko širše pH območje, tj. pH 1.0-1.2. V primeru želatinastih kapsul ali tablet z želatinsko ovojnico je uporaba encimov lahko sprejemljiva (1, 8). EMA lahko zahteva dodatne preiskave pri pH vrednosti, v katerih ima učinkovina najnižjo topnost (1). Uporabo kateregakoli surfaktanta po priporočilih EMA ni sprejemljiva (1). Razlika med regulatornima agencijama je v priporočenem volumnu medija za sproščanje, ki je po priporočilih EMA manjši (500 ml vs. 900 ml) (1, 8).

Da se omogoči statistično ovrednotenje profilov sproščanja, obe regulatorni agenciji priporočata uporabo najmanj 12 enot zdravila za vsak poskus. Vzorci pa naj bi bili zbrani v zadostnem številu za okarakteriziranje profila sproščanja farmacevtske oblike. Priporočeno vzorčenje po FDA je npr. 10, 15, 20 in 30 minut, priporočila EMA poleg omenjenih časovnih vzorcev vsebujejo še vzorec ob 45 minutah (1, 8).

EMA dodatno priporoča testiranje več kot ene same serije testne in referenčne formulacije, s čimer naj bi se zagotovila reprezentativnost rezultatov (1).

15.2.1.2. Vrednotenje rezultatov *in vitro* sproščanja

Kadar obe, testna in referenčna formulacija sprostita 85% ali več predpisane količine učinkovine v ≤ 15 minutah, primerjava profilov z f_2 testom ni potrebna (1, 8). V primeru FDA je slednje potrebno dokazati v vseh zahtevanih medijih, medtem ko EMA ne daje podrobnejših priporočil (8, 1).

Kakorkoli, pa se EMA in FDA v opredelitvi hitrega sproščanja iz formulacije, ki je eden od pogojev za opustitev bioekvivalenčne študije, razlikujeta. Medtem ko se po EMA bioekvivalenčni smernici (1) učinkovina sprošča iz formulacije hitro, kadar se več kot 85% predpisane količine raztopi v 15 minutah, pa je FDA (8) pri tej opredelitvi nekoliko manj stroga. In sicer, sproščanje iz farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem po mnenju FDA velja za hitro, kadar se ne manj kot 85% predpisane količine učinkovine sprosti v 30 minutah (8). Kadar je skoraj popolno sproščanje (vsaj 85% predpisne količine učinkovine) doseženo v več kot 15 min in ne več kot 30 min pa je po priporočilih EMA kot tudi FDA potrebno dokazati odsotnost pomembnih razlik (podobnost) v sproščanju. V tem primeru za primerjavo profilov sproščanja testnega in referenčnega zdravila EMA in FDA priporočata uporabo faktorja podobnosti (f_2) (za podrobnosti glej točko 11.3) ali drug ustrezen test (1).

15.2.2. Pomožne snovi

Čeprav je vpliv pomožnih snovi pri farmacevtskih oblikah s takojšnjim sproščanjem na biološko uporabnost dobro topnih učinkovin s popolno absorpcijo (tj., BCS razred I) malo verjeten, ga ne smemo povsem izključiti (1).

Obe regulatorni agenciji tako priporočata, da naj bi se za učinkovine BCS razreda I uporabljale dobro uveljavljene pomožne snovi v običajnih količinah. Zahtevata opredelitev

vloge pomožnih snovi z utemeljitvijo, ali je količina vsake od pomožnih snovi v zdravilu skladna z namenom uporabe (1, 8). EMA zahteva še dodatno preučitev možnih interakcij, ki lahko vplivajo na biološko uporabnost in/ali topnost (1). FDA pa zahteva dodatne podatke, ki dokazujejo odsotnost vpliva na BU učinkovine le, kadar so v trdno farmacevtsko obliko s takojšnjim sproščanjem vključene nove pomožne snovi ali neobičajno velike količine pogosto uporabljenih pomožnih snovi (8). Take informacije je mogoče dobiti s študijo relativne biološke uporabnosti z uporabo enostavne vodne raztopine kot referenčno zdravilo (8).

Pomožne snovi, ki lahko vplivajo na biološko uporabnost, kot so sladila sorbitol in manitol ter natrijev lavril sulfat, polisorbitat 80 in ostale površinsko aktivne snovi so lahko problematične (8). Po priporočilih EMA je zato potrebno opredeliti možen vpliv teh pomožnih snovi na:

- gastrointestinalno motiliteto,
- dovzetnost za interakcije z učinkovino (npr. kompleksacijo),
- permeabilnost učinkovine in
- interakcije z membranskimi transporterji (1).

Po priporočilih EMA veljajo za učinkovine BCS razreda III poleg zgornjih postavk še nekatere dodatne zahteve. In sicer, medtem ko je v primeru učinkovin razreda I zgolj priporočljivo, da se v sestavi testne formulacije uporabljajo podobne količine enakih pomožnih snovi kot v referenčni formulaciji, pa EMA pri uporabi pristopa opustitve bioekvivalenčnih študij za učinkovine BCS razreda III zahteva, da so pomožne snovi kvalitativno enake in kvantitativno zelo podobne (1). Kakorkoli pa naj bi bile pomožne snovi, ki lahko vplivajo na biološko uporabnost, v testnem in referenčnem zdravilu kvalitativno in kvantitativno enake (1).

15.3. Zdravila, ki so fiksne kombinacije odmerkov

Pristop opustitve bioekvivalenčnih študij na osnovi BCS je po priporočilih EMA uporaben tudi za zdravila, ki so fiksne kombinacije odmerkov, če vse učinkovine pripadajo BCS razredu I ali III in pomožne snovi izpolnjujejo zahteve, navedene v točki 15.2.2 (1).

15.4. Predzdravila

Permeabilnost predzdravil zavisi od mehanizma in mesta pretvorbe v učinkovino. FDA priporoča, da kadar se izkaže, da se pretvorba predzdravila v učinkovino pojavi predvsem po prehodu intestinalne membrane, naj bi se permeabilnost predzdravila izmerila. Kadar pa se ta pretvorba pojavi pred prehodom intestinalne membrane, naj bi se določila permeabilnost učinkovine. Pomembni so lahko podatki o sproščanju in odvisnost topnosti od pH obeh, predzdravila in učinkovine (8).

16. Viri

1. Guideline on the Investigation of Bioequivalence; CPMP/QWP/EWP/1401/98 Rev. 1; London, Januar 2010.
(<http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/qwp/140198enrev1fin.pdf>)
2. Note for Guidance on Modified Release Oral and Transdermal Dosage Forms: Section II (Pharmacokinetic and Clinical Evaluation); CPMP/EWP/280/96 Corr *; London, Julij 1999 (<http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/ewp/028096en.pdf>)
3. Questions & Answers: Positions on specific questions addressed to the EWP therapeutic subgroup on Pharmacokinetics EMEA/618604/2008 Rev. 1; London, Julij 2009 (<http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/ewp/61860408en.pdf>)
4. Guideline on Clinical Development of Fixed Combination Medicinal Products; CHMP/EWP/240/95 Rev. 1; London, Februar 2009
(<http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/ewp/024095enfin.pdf>)
5. Guideline on Validation of Bioanalytical Methods; EMEA/CHMP/EWP/192217/2009; November 2009 (<http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/ewp/19221709en.pdf>)
6. Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products — General Considerations; Marec 2003
(<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070124.pdf>)
7. Guidance for Industry: Food-Effect Bioavailability and Fed Bioequivalence Studies; December 2002
(<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070241.pdf>)
8. Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System; Avgust 2000
(<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070246.pdf>)
9. Guidance for Industry: Statistical Approaches to Establishing Bioequivalence; Januar 2001
(<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070244.pdf>)
10. Guidance for Industry: Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation, and Application of In Vitro/In Vivo Correlations; September 1997
(<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070239.pdf>)
11. Guidance for Industry: Submission of Summary Bioequivalence Data for ANDAs; April 2009
(<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM134846.pdf>)
12. Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms; Avgust 1997
(<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070237.pdf>)
13. Guidance for Industry: Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls, In Vitro Dissolution

- Testing, and In Vivo Bioequivalence Documentation; November 1995
(<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070636.pdf>)
- 14.** Guidance for Industry: SUPAC-MR: Modified Release Solid Oral Dosage Forms Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls, In Vitro Dissolution Testing and In Vivo Bioequivalence Documentation; September 1997
(<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070640.pdf>)
 - 15.** Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation; May 2001
(<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>)
 - 16.** Individual Product Bioequivalence Recommendations; December 2009
(<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm075207.htm>)
 - 17.** Drugs@FDA Glossary of Terms; January 2010
(<http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ucm079436.htm>)
 - 18.** Code of Federal Regulations Title 21, PART 320 – Bioavailability and Bioequivalence Requirements (<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRsearch.cfm?CFRPart=320>)
 - 19.** Note for Guidance on the Investigation of Bioavailability and Bioequivalence; CPMP/EWP/QWP/1401/98; July 2001
(<http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/qwp/140198enfin.pdf>)