

# Biyoyararlanım ve İlaçta AR-GE Çalışmaları

## Oturum Başkanları:

Prof. Dr. Tuncel ÖZDEN  
ECZ Fırat ATEŞ

## **OTURUMBAŞKANI**

- Bilindiği üzere bütün ülkelerde ve özellikle Avrupa Birliği ülkelerinde jenerik ilaç kullanımı, orijinal ilaç kullanımına göre gittikçe artmakta. Özellikle parasal olarak artmasa da, kutu olarak büyük bir artış göstermektedir. Jenerik ilaç ruhsatlandırmasında da en önemli konu, jenerik ilacın orijinal ilaçla aynı etkiyi gösterebilmesi için vücutta aynı şekilde dağılması ve etki yerine, belli bir oranda orijinal ilaçta aynı şekilde olmasıdır.

Bu bölümümüzde özellikle Türk Eczacıları Birliği'nin ve İstanbul Ecza-Koop ve Türkiye Teknoloji Geliştirme Vakfı ve EGAŞ'ın beraberce kurdukları, Novagenix Blo-Analltik İlaç Araştırma-Geliştirme Merkezinde yapılan blyoeşdeğerlik çalışmaları, değişik ilaçlar üzerinde ve değişik cihazlar kullanılarak yapılan üç analiz çalışması arkadaşlarımız tarafından sizlere sunulacaktır.

## **OTURUM BAŞKANI**

- "Biyoyararlanım ve İlaçta AR-GE Çalışmalarına hoş geldiniz.

Klaritromisin İçeren İki farklı müstahzarın sağlıklı gönüllülerde blyoeşdeğerlilik çalışmasını sunmak üzere Uzm. Kim. Müberra Şen'i davet ediyorum.



## **Uzm.Kim. MÜBERRA ŞEN**

Novagenix Bioanalitik ilaç, AR-GE Birimi

### *"Klaritromisin İçeren İki Farklı Müstahzarın Sağlıklı Gönüllerde Biyoeşdeğerlik Çalışması"*

-Teşekkürler.

**Ö**ncelikle 8.Türkiye Eczacılık Kongresi'ni düzenleyen ve Novagenix Bio-Analitik İlaç AR-GE Merkez'ine, çalışmalarımızı sunma fırsatı veren Türk Eczacıları Birliği'ne çokteşekkür ediyorum.

Novagenix Bio-Analitik İlaç AR-GE'de yürüttüğümüz çalışmamızın konusu, sağlıklı gönüllülerde klaritromisinin LC-MST yöntemiyle biyoeşdeğerlik çalışması.

LC-MST yöntemiyle plazmada klaritromisin ve aktif metaboliti 14-OH klaritromisin için miktar tayini yapılarak, orijinal ilaç ile jenerik ilacın biyoeşdeğerliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmanın ilk aşaması olan klinik çalışma ise, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İyi Klinik Uygulamaları Merkez'inde yapılmıştır. Üç çeşit eşdeğerlikten bahsedecek olursak, ilki farmasötik eşdeğer. İki farklı müstahzar, aynı etken madde/maddelerin aynı miktarını, aynı veya karşılaştırılabilir standartlara uyan farmasötik şekiller içerisinde içermektedir. Terapötik eşdeğer, bir müstahzarın etkenliği ve güvenilirliği daha önce tespit edilmiş bir başka müstahzar ile aynı etkenlik ve güvenilirliği klinik olarak gösterilmesidir.

Biyoeşdeğerlik ise, farmasötik eşdeğer olan iki müstahzarın aynı molal dozda verilmesinden sonra, biyoyararlanımlarının, yani adsorpsiyon hızı ve derecelerinin ve böylece etkilerinin hem etkinlik, hem güvenlik bakımından esas olarak, aynı olmasını sağlayacak derecede benzer olmasıdır. Kısaca biyoeşdeğerlik, iki veya daha fazla ilacın biyoyararlanımlarının karşılaştırılmasıdır.

Çalışmamızın klinik aşamasında yaşları 18-45 arasında 24 sağlıklı erkek gönüllüye, aç karnına çaprazlama ve tek doz olarak klaritromisin içeren tabletler uygulanmış, ilaç verildikten sonra 48. saate kadar değişik zamanlarda toplam 15 noktada kan alınmıştır. Toplanan kanlardan elde edilen plazmalar, soğuk zincir koşullarında Novagenixe nakledilmiş ve söz konusu etkin maddelerin miktar tayinleri için analizleri yapılmıştır.

Klaritromisin, oral yoldan kullanılan makrolid grubundan bir antibiyotiktir. Kimyasal yapısı 6-o-metlletromisin'dir. Duyarlı mikroorganizmaların 50s rlbzomal alt-brimlerine bağlanıp, protein sentezini inhibe ederek antibakteriyel etkinlik gösterir.

Ana metaboliti 14-OH klaritromisin aktif olup, antibakteriyel etkiye katkıda bulunur. Klaritromisin duyarlı mikroorganizmaların neden olduğu alt ve üst solunum yolları enfeksiyonları ile deri ve deri eklerinin enfeksiyonlarında kullanılır.

Burada klaritromisinin ve 14-OH klaritromisinin yapısal formülünü görmekteyiz.

**B**u slaydımızda analitik çalışmamızda kullandığımız ekipmanımız yer almaktadır. Burada gördüğünüz Agilent HP 1100 Serisi bir HPLC sistemidir. Burada gördüğünüz kısım ise, detektör olarak kullandığımız MSD sistemidir. HPLC sisteminden gelen sıvı akışkan, MSD sisteminde iyonlaştıktan sonra manyetik alana verilir. Manyetik alandan çıkan farklı M/E değerlerine sahip iyonlar detektörle kaydedildikten sonra örneğimize kütle spektrumu elde edilir.

Asetonitril, metanol, amonyum asetat ve su karışımından hazırlanan hareketli fazımız, Genesis C18 analitik kolona dakikada 1,2 mililitre akışla verilir. Toplam 4 dakikalık analiz süresinde klaritromisin 2,55. dakikada, 14-OH klaritromisin 1,77. dakikada ve iç standart olarak kullandığımız Roksitromisin ise 2,68. dakikada gelmektedir.

Çalışmamızda iç standardı estrakslyonda herhangi bir hatanın olup olmadığını anlamak için kontrol amacıyla kullanıyoruz.

Plazma örneklerine bilinen konsantrasyonda klaritromisin, 14-OH klaritromisin ve roksitromisin eklenerek, test edilen validasyon parametreleri şunlardır: Özgünlük ve seçicilik, kalibrasyon eğrisi ve doğrusalılık, en küçük ölçülebilir konsantrasyon, doğruluk ve kesinlik, geri kazanım ve stabilite.

Klaritromisin miktar tayini yönteminin validasyonu için, "Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. FDA, 2001 "de belirtilen ölçütler kullanılmıştır.

İlaç etkin maddesinin bir farmasötik formülasyondan tayini, bu formülasyonun çözeltisinin içerisindeki analitiğin ilaç etkin maddesinin tayin edilmesini kapsar. Ancak plazmadaki ilaç etkin maddesinin tayininde kan proteinleri, yağ, fibrin ve fibrinojenleri ortamdaki uzaklaştırmak gerekir. Analitik yöntemi geliştirirken, analitin alıkonulma zamanında başka herhangi bir matriks etkisi olmamalı, yöntem sadece analite özgü ve analiti seçici olmalıdır. Bu nedenle yöntemimiz valide edilirken, en az 6 farklı insan plazması örneği, seçicilik ve özgünlük açısından test edilmiş, klaritromisin, 14-OH klaritromisin ve roksitromisin yerinde herhangi bir gelişim olmadığı gözlemlenmiştir.

**B**uradaki slaydımızda, hiç analit içermeyen plazma örneğine alt spektrum görülmektedir. Gerçekten klaritromlsin, 14-OH klaritromlsin ve roksitromlsin piklerinin alıkonulma zamanlarında hiçbir pik gözlenmemiştir.

Bu şeklimizde, yalnızca Internal standart olan roksitromlsin içeren plazmaya alt spektrum görülmektedir. Burada da roksitromlsin pikini görmekteyiz.

Bu şeklimiz 5000 ng/mL klaritromlsin, aktif metabolit 3000 ng/mL 14-OH klaritromlsin ve iç standart roksitromlsin içeren plazmaya alt spektrum.

Klaritromlsin ve 14-OH klaritromlsin sıvı sıvı ekstraksiyon yöntemiyle plazmada ekstrakte edilmiş, sırasıyla 50-5000 ng/mL ve 15-3000 ng/mL aralığında kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Bu eğrinin doğrusal olduğu aralıktaki konsantrasyon-yanıt ilişkisinin korelasyon katsayıları 5 günlük valdasyon sırasında ortalama 0.99948 olarak bulunmuştur.

Burada da 14-OH klaritromlsin ve klaritromlsine ait kalibrasyon doğruları yer almaktadır. Yöntemin geliştirilmesi sırasında doğru ve tekrarlanabilen ölçülen en küçük konsantrasyon, klaritromlsin için 50 ng/mL, 14-OH klaritromlsin için 15 ng/mL olarak bulunmuştur.

Valdasyon parametrelerinden doğruluk ve kesinliği açıklayacak olursak, doğruluk bulunan değerlerin teorik değere olan yakınlığı; kesinlik ise, bulunan değerlerin birbirine olan yakınlığıdır. Doğru ve kesinlik 5 günlük valdasyon sırasında kalite kontrol örnekleriyle, gün içi ve günler arası olarak değerlendirilmiştir.

Klaritromlsinin kalite kontrol örneklerinin gün içi doğruluk ve gün içi kesinlik değerleriyle günler arası doğruluk ve günler arası kesinlik değerleri slaytta görülmektedir.

Burada da 14-OH klaritromlsinin kalite kontrol örneklerinin gün içi doğruluk, gün içi kesinlik, günler arası doğruluk ve günler arası kesinlik değerlerini görmekteyiz.

Klaritromlsinin kalibrasyon standartlarının günler arası doğruluk, gün içi kesinlik, 14-OH klaritromlsinin kalibrasyon standartlarının günler arası doğruluk ve gün içi kesinlik değerleri de bu slaydımızda yer almaktadır.

Ekstre edilen, bilinen konsantrasyondaki plazma örnekleri, aynı konsantrasyondaki çözeltilerin bulunan değerleriyle karşılaştırmıştır. Sonuçta mutlak geri kazanım yüzde 98 ve tekrarlanabilir olarak bulunmuştur.

Valdasyondaki bir diğer parametre ise, stablitedir. Stabilité, yöntem geliştirme sırasında ve analitiğin tüm analiz süreleri boyunca çok önemlidir. Bu yüzden analitin stok çözelti stablitesine, donma-çözünme stablitesine, oda ısısındaki stablitesine ve uzun süreli stablitesine bakılır. Bu çalışmada örnekler hazırlanmış ve oda ısısında otoörnekleyici 69 saat bekletilerek, stablitesine bakılmıştır. FDI kurallarına göre stabl olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak, laboratuvarımızda özgün olarak geliştirip valide ettiğimiz analiz yöntemi, blyoeşdeğerlik çalışmalarının klinik aşamasında elde edilen plazma örneklerindeki klaritromlsin ve 14-OH klaritromlsin tayini için uygulandığında; doğru ve hassas bir yöntem olduğu görülmüştür

Konsantrasyon zaman eğrisinden farmakokinetik profili elde edebiliriz.

Burada klaritromisin test ve referans ilaçlardaki farmakokinetik profili görülmektedir. Her iki ilacın da farmakokinetik profili birbirine uygun olarak görülmektedir.

Burada da 14-OH klaritromisin test ve referans ilaçlardaki farmakokinetiklerini görmekteyiz. Konsantrasyon zaman eğrisinden elde edilen farmakokinetik profil, farmakodinamik etkinliğinin ve ilacın etkinliğinin başlama süresinin ve devam etmesi süresinin belirlenmesi açısından çok önemlidir.

Burada da klaritromisin test ve referans ilaçlardaki in dönüşümünün farmakokinetik profili yer almaktadır.

Son şeklimizde de, 14-OH klaritromisin test ve referans ilaçlardaki in dönüşümünün farmakokinetik profilini görmekteyiz.

Bu slaytta biyoeşdeğerlik çalışmalarında kullanılan kriterler kısaltmaları ve açık isimleriyle yer almaktadır. Biz bu kriterlerden C-max, yani maksimum plazma konsantrasyonu, AUCt, yani ilaç alımından t zamanına kadar ulaşan plazma konsantrasyon eğrisi altında kalan alan ve AUC0-∞, yani plazma konsantrasyon eğrisinin ekstrapole edilmesiyle oluşan, eğri altında kalan alan kriterlerini kullanarak, bir tablo oluşturduk.

Burada bu üç parametrenin klaritromisin için ortalama değerleri ve standart sapma değerleri, hem test ilaç, hem de referans ilaç için yer almaktadır. Buradan da görüldüğü gibi, bu değerler birbirlerine yakınlık göstermektedir.

Bu son tablomuzda da, 14-OH klaritromisin bu üç kriter için ortalama ve standart sapma değerleri, hem test ilaç, hem de referans ilaç için yer almaktadır.

Tüm bu veriler incelendiğinde, yüzde 90 güvenlik aralığında çıkan bu kriterler sonucunda, hem test ilacın, hem de referans ilacın biyoeşdeğer olduğu bulunmuştur.

**Y**aklaşık 7 yıl öncesine kadar ülkemizde hiç yapılmayan biyoyararlanım, biyoeşdeğerlik çalışmalarının tüm aşamalarının artık yetkinlikle yapılabilmesinin, hem bu alandaki bilgi birikimi ve teknik becerinin artması, gelişmesi, hem de ekonomik öz kaynaklarımızın ülke içinde kalmasından dolayı çok önemli getirilen olduğunu düşünüyor ve bizim gibi laboratuvarların ülkemizde çoğalmasını diliyoruz.

Çok teşekkür ederim.

## **OTURUM BAŞKANI**

-Uzm. Kim. MüberraŞen'e teşekkür ediyoruz.

Aztlromisin içeren iki farklı müstahzarın sağlıklı gönüllülerde biyoeşdeğerlik çalışmasını sunmak üzere YKim. Nesrin Yüzüak'ı kürsüye davet ediyoruz.



## Y. Kim. NESRİN YÜZÜAK

Novagenix Bioanalitik ilaç, AR-GE Birimi

### *"Azitromisin İçeren Farklı İki Müstahzarın Sağlıklı Gönüllerde Biyoeşdeğerlik Çalışması"*

**T**abii ki arkadaşımız da bahsetti, amacımız LC-MS/ MS yöntemiyle plazmada azitromisin miktar tayini yaparak, orijinal ilaç ile jenerik ilacın biyoeşdeğerliğinin araştırılmasıdır.

Bu çalışmanın ilk aşaması olan klinik çalışma da Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İKU Merkezinde yapılmıştır.

Çalışmanın klinik aşamasında, yaşları 18-45 arasında olan 24 sağlıklı erkek gönüllüye aç karnına, çaprazlama ve tek doz olarak azitromisin içeren tabletler uygulanmış; ilaç verildikten sonra 96. saate kadar değişik zamanlarda (Toplam 17 noktada) kan alınmıştır. Toplanan kanlardan elde edilen plazmalar soğuk zincir koşullarında Novagenix'e nakledilmiş ve söz konusu etkin maddelerin miktar tayini analizleri yapılmıştır.

**G**önüllü sayısı; pilot çalışmalardan, yayınlanmış verilerden ve çeşitli istatistiksel hesaplamalardan (Westlake, Hauschke, Steijans gibi) elde edilen hata varyansına göre en az 12 katılımcı olmak kaydıyla gönüllü sayısına karar verilmiştir. Örnek alım süreleri; eğri altı alan, maksimum konsantrasyon süresi, eliminasyon ve yarılanma ömrü gibi parametrelere göre optimize edilmiştir.

Burada da görüldüğü gibi, arkadaşımızinki 48 saate kadar kanları alınmıştı. Benim çalışmamda ise 96. saate kadar kanlar alınmış. Buna da şöyle karar veriyoruz: Önce ilacın bir yarılanma ömrü,  $t_{1/2}$  yarılanma ömrü var. En az 3  $t_{1/2}$  zamanına kadar kanlarını alıyoruz.

Bir de, test ve referans ilacı arasında tabii ki, test ilacı yuttuktan sonra sağlıklı gönüllü, direkt tabii ki referans ilacı vermiyoruz, bir boşalt periyodumuz var, yani ilaçların arınma süresi. Bu da yarılanma ömrünün, ilacın yarılanma ömrünün en az 5 katı kadar olmalı.

Azitromisin oral yoldan kullanılan azalit grubu bir antibiyotik. Kapalı formülü C38H72N2O12'dir.

Mikroorganizmaların 50s ribozomal alt-birliklerine bağlanıp, protein sentezini inhibe ederek antibakteriyel etkinlik gösterir

Azitromisin duyarlı mikroorganizmaların neden olduğu hafif ve orta dereceli enfeksiyonların tedavisinde kullanılır: alt ve üst solunum yolları enfeksiyonları, deri ve deri eklerinin enfeksiyonu, uretral, servisit, şankroid.

Azitromisin'in yapısal formülü şekilde görüldüğü gibidir.

Burada analitik çalışmamızı yaparken, Waters 2695 HPLC Sistemi, ardışık kütle spektrometresi ve MassLynx Software V4.1. kullanılmıştır.

LC-MS/MS koşullarımıza bakacak olursak, mobil faz olarak Asetonitril: Metanol: Su: Asetik Asit kullanılmıştır. Analitik kolonumuz SunFire C18, 3.5 /um, 50x2.1 mm'dir. Akış hızımız 0,2 mL/dk. Toplam analiz süresi 2 dakika. Azitromisin için alıkonulma süresi 0,9 dakika, roksitromisin için ise 1,1 dakika olarak bulunmuştur.

Tabii, arkadaşımız MST kullandı, ben bu yöntemde MS/MS kullandım. MS/MS, daha hassas analizlerde kullanılan daha düşük nanogramlara inebilmek için bize daha kolaylık sağlayan bir aletimiz. MS'lerde her ne kadar alıkonulma süreleri birbirine yakınsa da, ayırımı M/Z oranlarına göre yaptığı için, bize daha kolaylık sağlıyor, yani üst üste çakışmalar bile, farklı pikleri elde edebiliyoruz.

Metodumuzu geliştirdikten sonra, tabii ki doğruluğunu kanıtlamak amacıyla validasyon yapıyoruz. Validasyonda da baktığımız parametreler, özgünlük ve seçicilik, kalibrasyon eğrisi ve doğrusalılık, en küçük ölçülebilir konsantrasyon, doğruluk ve kesinlik, geri kazanım ve stabilitedir.

Bütün bu gördüğünüz parametreler, plazma örneklerine bilinen konsantrasyonlarda azitromisin ve roksitromisin (iç standart) eklenerek test edilmiştir.

**A**zitromisin'in miktar tayin yönteminin validasyonu için, "Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. FDA, 2001"de belirtilen ölçütler kullanılmıştır. Özgünlük ve seçiciliğe bakacak olursak, ilaç etkin maddesinin bir farmasötik formülasyondan tayini, bu formülasyonun çözeltilisinin içerisindeki analitin (ilaç etkin maddesi) tayin edilmesini kapsar. Ancak, plazmadaki ilaç etkin maddesinin tayininde kan proteinleri, yağ, fibrin ve fibrinojenleri (yani matriks etkilerini) ortamdaki uzaklaştırmak gerekir. Analitik yöntemi geliştirirken analitin tayin edildiği yerde başka herhangi bir matriks etkisi olmamalı, yöntem sadece analite özgü ve analiti seçici olmalıdır.

Bu nedenle, yöntemimiz valide edilirken en az altı farklı insan plazması örneği seçicilik ve özgünlük açısından test edilmiş, azitromisin ve roksitromisin piklerinin yerinde herhangi bir girişimin olmadığını gösterilmiştir. İçerisinde hiç analitin olmadığı plazma örneği (Blank) ile sadece iç standartın bulunduğu (Zero) örnekleri analiz edilerek, özgünlük ve seçicilik her analizde ayrı ayrı gösterilmiştir.

Buradaki spektruma bakacak olursak, bu spektrumumuz blanke ait bir spektrum; neanalit, ne iç standart var.

Buna bakacak olursak, azitromisin'in olduğu yerde büyük bir pik yoktu.

Şurada bakacak olursak, roksltromisln var, ama gene analitimlz yok, sadece iç standardın olduğu bir spektrum. Bu da, 2 ng/mL

Kaiibrasyon eğrisi ve doğrusallığa bakacak olursak, Azltromisinin sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemiyle plazmadan ekstre edilmiş; 2-1000 ng/mL aralığında kaiibrasyon eğrileri çizilmiştir.

Bu eğrinin doğrusal olduğu aralıktaki konsantrasyon-yanıt ilişkisinin korelasyon katsayıları 5 günlük validasyon sırasında ortalama olarak 0.99158 bulunmuştur.

Bu da, 2-1000 ng/mL aralığındaki azitromisln'in kaiibrasyon doğrusuna bir örnek.

**Y**öntemin geliştirilmesi sırasında, doğru ve tekrarlanabilir ölçülen en küçük konsantrasyon azltromisin için 2 ng/mLolarak bulunmuştur. Bulunan değerin teorik değere yakınlığı olan DOĞRULUK ve bulunan değerlerin birbirlerine yakınlığı olan KESİNLİK, beş günlük validasyon sırasında kalite kontrol örnekleri ile gün-içi ve günler-arası olarak değerlendirilmiştir. Kalite kontrol örneklerinin gün-içi doğruluğu: % 86.18-114.75, kesinliği : % 5.64-18.76. Kalite kontrol örneklerinin günler-arası doğruluğu: % 91.75-110.07, kesinliği: % 8.96-14.08. Kaiibrasyon standartlarının günler-arası doğruluğu: % 91.83-108.82, kesinliği: % 2.71-7.25.

Geri kazanıma bakacak olursak, evet biz plazmadan analiti ekstre ediyoruz diyoruz, ama ne kadarını ekstre ediyoruz. Ekstre edilen bilinen konsantrasyondaki plazma örnekleri, aynı konsantrasyondaki çözeltilerin bulunan değerleri ile karşılaştırılmıştır. Bu yöntemdeki mutlak geri kazanımımız yüzde 81,97.

**B**ir diğer önemli parametremiz de, stabilité. Stabilité için de stok çözeltisi stabilitesi. Bir stok hazırlıyoruz, ama bu stoku bir ay, iki ay, üç ay kullanmamız gerekiyor; ama gerçekten stabll mi, değil mi diye, rutin periyotlarla, aralıklarla bunların tekrar enjeksiyonlarını yaparak, cihaza vererek, gerçekten stabilitesi var mı, yok mu, buna da bakıyoruz. Donma-çözülme stabilitesi ise, plazmada çalıştığımız için, plazmanın eksi 70 derecede saklanması gerekiyor. Validasyonunu yaparken de, kendimiz dondurup çözüyoruz ki, dondurup çözme sırasında da bir stabilité kaybı var mı görelim; çünkü bize nakledilirken soğuk zincir koşullarıyla donmuş bir şekilde geliyor, biz onları eritip, ekstraksiyonlarını yapıyoruz. Bu da önemli bir faktör. Validasyon sırasında da en az beş kez dondurup, çözüyoruz. Tabii ki, bazı maddelerin stabilitesi beş kerede bitiyorsa, bazılarının ki on kerede bitiyor. Bunu da, maddenin miktarında azalma olmasın, yanlış sonuçlar elde etmeyelim diye yapıyoruz.

Oda ısısındaki stabilitesine bakıyoruz. Uzun süreli stabilltesinde de örnekler hazırlanıyor, oda ısısında bekletiliyor. Benim çalışmam için 115 saat oda ısısında stabilitesi var.

Sonuç olarak laboratuvarımızda özgün olarak geliştirip, valide ettiğimiz analiz yöntemimizin biyoeşdeğerlik çalışmalarının klinik aşamasında elde edilen plazma örneklerine azltromisin tayini için uygulanmıştır.

Biyoeşdeğerlik çalışmamızda kullanılan kriterlerimize bakarsak, c-max dediğimiz maksimum plazma konsantrasyonu, c-minimum dediğimiz minimum plazma konsantrasyonu, c-averaj dediğimiz ortalama plazma



konsantrasyon, t-max maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşma süresi.  $t_{1/2}$ , demin de bahsettiğim gibi, ilacın yarılanma ömrü, etkin maddenin yarılanma ömrü.

AUC<sub>0-</sub>, plazma konsantrasyon eğrisinin ekstropole edilmesiyle oluşan eğri altında kalan alan.

AUC<sub>t</sub> ise, ilacın alımından t zamanına kadar oluşan plazma konsantrasyon eğrisi altında kalan alan.

Azitromisin için test ve referans ilacın farmakokinetik eğrisine bakıyoruz. Zamana karşı azitromisin konsantrasyonu baz alınarak çizilmiştir.

Bahsettiğimiz bu eğri altında kalan alan, bu şekilde gördüğümüz eğrinin altında kalan alan.

Bu da, azitromisinin ln konsantrasyonuna karşı zaman grafiği.

**D**emin de arkadaşımın bahsettiği gibi, biyoeşdeğerdir diyebilmemiz için üç parametreye bakıyoruz. Bu üç parametre, c-max, AUC<sub>0-t</sub> ve AUC<sub>0-</sub>. Bu üç parametre test ve referans ilaç için karşılaştırılıyor ve istatistiksel hesaplar sonucunda biyoeşdeğer olduğuna karar veriliyor.

Ortalama c-max'ları test ve referans ilaç için birbirine yakın. Eğri altında kalan alanlarımız gene, her iki etkin madde için de birbirine yakın.

Teşekkür ediyorum.

#### **OTURUM BAŞKANI**

-Biz de YKim. Nesrin Yüzüak'a teşekkür ediyoruz.

İndapamid içeren farklı iki müstahzarın sağlıklı gönüllülerde biyoeşdeğerlik çalışmasını sunmak üzere Uzm.Kİm. Zelliha Ateş'i kürsüye davet ediyorum.

## **Uzm.Kim. ZELİHAATEŞ**

Novagenix Bioanalitik ilaç, AR-GE Birimi

### *"İndapamid İçeren İki Farklı Müstahzarın Sağlıklı Gönüllerde Biyoeşdeğerlik Çalışması"*

- Tekrar herkese hoş geldiniz diyorum.

Benzer bir konuda üçüncü çalışmayı anlatmak benim için biraz zor olacak. Umarım, sıkıcı olmam.

Yine Novagenix Bio-Analitik İlaç Araştırma Merkezi'nde yapılan bu çalışmada, indopomintin iki yönlü tek doz ve çapraz tasarımlı biyoeşdeğerlik çalışmasından bahsedeceğim.

**A**rkadaşımın bahsettiği gibi, biyoeşdeğerlik, terapötik eşdeğerlik ve farmasötik eşdeğerlik birbirleriyle ilintili olan üç tanımlamadır. Terapötik eşdeğerliliğin saptanabilmesi için gerekli olan çalışmalardan biri de biyoeşdeğerlik çalışmalarıdır.

İndapamid miktar tayini için, orijinal ilaç ve jenerik ilacın biyoeşdeğerliliğinin araştırılması çalışması UPLC-TUV yöntemi ile yapılmıştır ve benden önceki iki çalışma gibi bu çalışmanın ilk aşaması olan klinik çalışma da, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İyi Klinik Uygulamaları Merkezi'nde yapılmıştır.

Orijinal ilaç ve eşdeğer ilacın tanımlamasını yapacak olursak, Orijinal ilaç, dünyada ilk kez ilaç olarak ruhsatlandırılarak pazara verilen yeni bir etkin maddeyi, belirlenen tedavi edici dozlarında içeren ürünlerdir. Eşdeğer ilaçlar, aynı etken maddeyi orijinal ilaçlarla aynı miktarda ve aynı farmasötik formda içeren ve böylece aynı farmakolojik etkiye sahip olan, kana geçiş hızı ve miktarı belli sınırlar içinde aynı olan ilaçlardır.

**E**şdeğer ilaçlarda, sağlık otoritelerinin gerekli gördüğü tüm inceleme ve araştırmalar yapılmakta orijinal ürünle aynı tedaviyi sağlayabileceği biyoeşdeğerlik adı verilen bilimsel çalışmalarla kanıtlanmaktadır.

Bu çalışma kullandığımız İndapamid oral yoldan kullanılan, diüretik ve antihipertansetip etkili bir ilaçtır, indapamid hipertansiyon ve kalp yetmezliği durumlarında tek başına ya da kombine preparatlar halinde yaygın olarak kullanılan bir ilaçtır.

İndapamidin yapısal formuna bakacak olursak, iki tane benzen halkası ve iki tane merkezden oluşmaktadır. İndapamidin yapısı bizim ekstraksiyon metodunu seçerken, plazmadan maddenin alınması açısından önem teşkil etmektedir.

Bu çalışma için uygun 24 gönüllü katılımcı sayısı belirlenmiş ve çapraz geçişli ve iki periyotlu olarak tasarlanarak, 15 kan alım noktasında gerçekleştirilmiştir. Toplanan kanlardan elde edilen plazmalar soğuk zincir koşullarında novagenixe nakledilmiş ve söz konusu etkin maddelerin miktar tayini için analizleri yapılmıştır.

Bizim çalışmamızda seçtiğimiz tek doz genellikle yeterli ve seçilen bir yöntemdir; fakat doza veya zamana bağlı farmakokinetik geçerliyse, bazı modifiye salınımlı ürünler söz konusu ise, tek dozlu alımların ardından yapılan ölçümlerde molekülün sensitive problemleri plazma konsantrasyonu ölçümlerini imkansız kılıyorsa, plazma konsantrasyonlarında eliminasyonda bireyler arası değişkenlik büyükse, çok dozlu tasarım da uygulanabilir.

Bunun yanında, çalışma dizaynında genellikle çapraz tasarım ilk seçimidir. Çapraz tasarım ile her gönüllüde yaş, cinsiyet, ağırlık, metabolizma gibi, bireyler arası değişimlerin etkisi minimize edilmektedir. Böylece test edilen sadece ilaç ürünü olmaktadır. Burada gördüğünüz grafik tabloda, bu çapraz tasarımı özetleyebiliriz. Bu sayede birinci grup hem test ürünü, hem referans ürünü aldığı için, bireyler arası değişkenlerin etkisi minimize edilmektedir.

**B**u çalışmanın analitik kısmında, ultra performans sıvı kromatografisi (UPLC), TUV detektör sistemi kullanılmıştır. Burada sistemi görmekteyiz. Benden önce arkadaşlarımdan bahsettiği iki çalışmanın birinde, MST, birinde de MS/MS yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışmanın farkı da, UPLC sisteminin kullanılmasıdır. UPLC sistemi Türkiye'de çok fazla yaygın olmamakla beraber, ben size cihaz üzerindeki kompartimanlardan bahsetmek istiyorum.

En önemli avantajlarından biri, daha kısa ve kolon iç çaplarının küçük olmasından dolayı, analiz sürelerini kısaltabilmemiz ve detektörün data toplama frekansının fazla olmasından dolayı daha hassas sonuçlar elde edebilmemizdir. UPLC sistemimizde Acquity C18, 2.1 x 100 mm, 1.7/ım analitik kolon ve Asetonitril : Fosfat Tamponu belli oranlarda hareketli faz olarak kullanırdan metodumuz geliştirilmiştir.

Burada İndapamid ve Sulfametazinin alıkonulma sürelerini görüyoruz. Fakat analiz süremize dikkat edecek olursak, 7 dakika gözüküyor. Analizimiz 2 dakika ya da 2,5 dakikada kesilebilecekken, 7. dakikada kesilmesinin sebebi ise, plazmadan gelen interfransalardan kurtulmak amacıyla.

Benden önceki arkadaşlarımın bahsettiği gibi, geliştirmiş olduğumuz yöntemin validasyonu için incelediğimiz 6 tane parametre vardır. Bu parametrelerin her biri yine İndapamid için geliştirilen metotta incelenmiştir.

**Y**ine, yöntemimizin valide edilirken, en az 6 farklı insan plazması örneğinin seçicilik ve özgünlük açısından test edilmiş ve indapamid ve interne! standart olan sulfametazin piklerinin alıkonulma zamanları civarında herhangi bir ilişkinin olmadığı saptanmıştır.

Burada İç standart olan sulfametazin ile analitin indapamid içermeyen boş plazmanın kromatogramını görmekteyiz. 0,7 civarında sulfametazin piki olması gerekirken, boş plazma olduğu için herhangi bir pik yokken, indapamid pikinin olduğu yerde yine hiçbir pik gözlenmemektedir.

Bu kromatogramda ise, sadece ilk standart sulfametazini içeren plazma örneği gözlemlenmektedir. Burada da sulfametazin pikini 0,7 civarında görmekteyiz.

Bu kromatogramda indapamid gelişimi 100 ng/mL olan ve ilk standart sulfametazini içeren plazma örneğini görmekteyiz. Yine İndapamid ve sulfametazin pikleri şekilde görülmektedir.

İndapamid sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile plazmadan ekstrakte edilmiş; 1-100 ng/mL aralığında kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Bu eğrinin doğrusal olduğu aralıktaki konsantrasyon-yanıt ilişkisinin korelasyon katsayıları 5 günlük validasyon sırasında ortalama 0,999 olarak hesaplanmıştır.

Elde ettiğimiz kalibrasyon verilerinden bir tanesi, 1-100 ng/mL değişim aralığında şekilde görülmektedir.

Yine, bu çalışma içinde en küçük ölçülebilir konsantrasyon İndapamid için 1 ng/mL olarak bulunmuştur. Ayrıca doğruluk ve kesinlik değerleri de, arkadaşlarımın bahsettiği gibi hesaplanmıştır.

İndapamid kalite kontrol örnekleri için gün içi doğruluk ve gün içi kesinlik ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri şekildeki gibi hesaplanmıştır ve kalibrasyon standartları içinde aynı doğruluk ve kesinlik değerleri hesaplanmıştır.

Ekstrakte edilen bilinen konsantrasyondaki plazma örnekleri, aynı konsantrasyondaki çözeltilerin bulunan değerleriyle karşılaştırılmış ve indapamid metodu için mutlak geri kazanım değeri 58,4 değeriyle hesaplanmış ve tekrarlanabilir olarak bulunmuştur.

Arkadaşların bahsettiği gibi, stabilite, analiz örneklerinin kararlılığı bizim için çok önem teşkil etmekte. Herhangi bir aksilik durumunda örneklerin beklemesi durumunda, örneklerimizin stabil kalması, örnek kaybı ya da örnek miktarının az olması açısından önem kazanıyor ve indapamid çalışması içinde, otoörnekleyicide 72 saate kadar kararlılığının olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, Laboratuvarımızda özgün olarak geliştirip valide ettiğimiz analiz yönteminin, biyoeşdeğerlik çalışmalarının klinik aşamasında elde edilen plazma örneklerine İndapamid tayini için uygulandığında; doğru ve hassas bir yöntem olduğu görülmüştür.

Diğer arkadaşlarımın bahsettiği gibi, biyoeşdeğerlik çalışmalarında hesaplanması gereken kriterlerden bazıları slaytta görülmektedir. Bunlar alınan biyolojik sıvının plazmaya da İdrar olmasına göre değişiklik

göstermektedir. Bizim hesapladığımız değerlerden bazıları Cmax, AUCt ve AUCO-t» değerlerindedir.

Burada da test ve referans ilacın farmakokinetik profilini görmekteyiz. Test ve referans için indapamid konsantrasyonuna karşı zaman grafiklerinin birbirlerinin içerisinde uyumlu olduğunu görmekteyiz. Grafik standart sapmayla beraber verilmiştir.

Aynı grafiğin İn dönüşümünü farmakokinetik profili de, kendi içerisinde uyum göstermektedir.

**E**nde edilen analiz sonuçlarına göre hesaplanan Cmax AUCO-t ve AUCO-oo değerlerine bakacak olursak, her biri 24 katı, ortalama ve standart sapma olarak tabloda gösterilmektedir. Bunların yüzde 90 gün aralığında olması gereken aralıkta olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak, yaptığımız bu indapamid biyoeşdeğerlik çalışmasını eşdeğer olarak sonuçlandırabiliriz.

Teşekkür ediyorum. (Alkışlar)

#### **OTURUM BAŞKANI**

- Uzm. Kim .Zeliha Ateş'e biz de teşekkür ediyoruz.

Soruları olan arkadaşlardan sorularını alabiliriz. Yok herhalde, çok teknik bir konu bu.

Sunumları yapan arkadaşlara ve dinlediğiniz için teşekkür ediyoruz.

#### **OTURUM BAŞKANI**

- Oturumumuzu kapatıyoruz. Herkese tekrar tekrar teşekkürler.