

Estudio de Bioequivalencia de Teofilina considerando Cinética de Michaelis-Menten

P. FAGIOLINO ¹, M. TURLIER ², H. PAYSSÉ ¹ y J.M. AIACHE ²

¹*Cátedra de Farmacología y Biofarmacia, Facultad de Química,
CC 1157, 11800 Montevideo, Uruguay y*

²*Laboratoire de Biopharmacie, Faculté de Pharmacie,
B.P. 38, 63001 Clermont-Ferrand, France*

RESUMEN. Se presenta un estudio de bioequivalencia de dos formas farmacéuticas de Teofilina de liberación prolongada, teniendo en cuenta la cinética no lineal de eliminación de esta droga. Una dosis de 300 mg de Teofilina fue administrada a 12 voluntarios sanos, en un diseño aleatorio, cruzado y compensado. Se utilizó una forma farmacéutica elixir, a los efectos de estimar los parámetros farmacocinéticos de eliminación en cada individuo. Como parámetros de evaluación de la biodisponibilidad se utilizó el área bajo la curva, la concentración máxima experimental, la dosis biodisponible y el tiempo durante el cual la concentración se mantuvo superior al 50% de la concentración máxima. Se aplicaron test estadísticos de análisis de la varianza, intervalos de confianza por estimación bayesiana y test bicaudal de bioequivalencia.

SUMMARY. "Bioequivalence Study of Theophylline considering Michaelis-Menten Kinetics". A bioequivalence study between two controlled-release forms of theophylline was performed, taking into account its non linear elimination kinetics. Three hundred mg of drug were given to twelve human volunteers with a randomized and crossover design. The elimination parameters were estimated from the oral administration of a solution of Theophylline. Area under the curve (AUC), experimental peak concentration (C_{max}), bioavailable dose (FD/V_d) and half value duration (HVD) were used as bioavailability parameters. Analysis of variance, bayesian approach for confidence intervals and bioequivalence two-one sided test, were performed.

INTRODUCCION

La bioequivalencia de formas farmacéuticas ha merecido en los últimos años una reconsideración de los procedimientos de evaluación estadística, como así también de los criterios de aceptación ^{1,2}.

La situación es aún compleja cuando la droga sigue una cinética de disposición no lineal, por ejemplo eliminación de tipo Michaelis-Menten.

Varias evidencias de una importante incidencia de eliminación no lineal se han reportado para teofilina ^{3,4,5}.

PALABRAS CLAVE: Teofilina, Bioequivalencia, Cinética no lineal.

KEY WORDS: Theophylline, Bioequivalence, Non linear kinetics.

En el presente informe se ensaya un procedimiento de evaluación de la bioequivalencia de dos formas farmacéuticas de liberación prolongada de teofilina, teniendo en cuenta todas estas circunstancias.

MATERIALES Y METODO

Formas Farmacéuticas

A los efectos de poder cuantificar la cinética de eliminación de la teofilina en cada voluntario del estudio, se administró una tercera formulación de rápida absorción, tal cual es un elixir (Forma B: 567 mg de teofilina por 100 ml de solución).

Las formas de liberación controlada fueron: comprimidos de 300 mg de teofilina anhidra (Forma A, producto de desarrollo) y cápsulas conteniendo 200 mg y 100 mg de teofilina anhidra, formulada como microgránulos de liberación prolongada (Forma C, producto del mercado europeo).

Sujetos

Doce voluntarios sanos fueron seleccionados para el estudio de acuerdo a una evaluación previa desde el punto de vista médico y bioquímico.

Se les solicitó la firma de un consentimiento escrito, luego de habérseles enterado de los objetivos del estudio y de los posibles efectos adversos.

Los voluntarios fueron de ambos sexos, de peso y edad promedio 60 kg y 32 años, respectivamente.

Dosis

Cada sujeto recibió una dosis de 300 mg de teofilina anhidra : 56,25 ml de la Forma B, 1 comprimido de la Forma A y 1 cápsula de 200 mg más 1 cápsula de 100 mg de la Forma C, seguida de un vaso de agua (200 ml aproximadamente).

Modo de administración

Las tres formulaciones fueron administradas según un diseño en tres vías, aleatorio, cruzado y compensado (Tabla 1).

El intervalo entre cada una de las administraciones fue de 1 semana. Los sujetos estaban en ayunas desde 10 horas antes de la administración hasta 4 horas después de la misma.

Muestreo

Se tomaron muestras sanguíneas de la vena antecubital a los siguientes tiempos: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24 y 36 horas post-administración de las Formas A y C. Para la Forma B el tiempo de muestreo fue: 0, 5, 15, 30, 45, 60, 90 minutos y 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 24 y 36 horas post-dosis.

Análisis químico

Los niveles plasmáticos de Teofilina fueron cuantificados por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), según técnica ya descrita ⁶.

Sujeto	A	B	C
1	1	2	3
2	3	1	2
3	2	3	1
4	3	2	1
5	1	3	2
6	2	1	3
7	1	2	3
8	3	1	2
9	2	3	1
10	3	2	1
11	1	3	2
12	2	1	3

Tabla 1. Modo de administración de las formas farmacéuticas (A: comprimidos, B: elixir, C: microgránulos) a los distintos voluntarios durante las 3 semanas que duró el ensayo.

Análisis farmacocinético

Para la serie de datos concentración-tiempo de cada individuo, luego de cada forma farmacéutica se determinó la concentración máxima experimental (C_{max}) y el área bajo la curva de niveles plasmáticos hasta las 36 horas (ABC 0-36) según el método de los trapecios.

Luego de un ajuste de los datos a la mejor curva multiexponencial, obtenida por análisis de regresión lineal con iteraciones, se calculó el tiempo durante el cual las concentraciones de Teofilina superaban el valor mitad de la C_{max} experimental (T50%). Este parámetro refiere a la forma de la curva C_t y para una droga e individuo dados su valor está inversamente relacionado con la velocidad de absorción.

A partir de las curvas de mejor ajuste puede estimarse la constante de velocidad de eliminación (β), del exponencial más pequeño.

Se estimó el área-bajo la curva de cero a infinito (ABC) luego de cada administración, extrapolando desde la última concentración experimental según cinética de primer orden, asumiendo como constante de velocidad de eliminación la calculada para la Forma B. Se realizó la extrapolación de esta manera, ya que tras la administración de las Formas A y C las constantes β calculadas están contaminadas por la fase de absorción de teofilina.

A partir de los datos provenientes de la administración de la Forma B, se estimó la posible cinética de eliminación no lineal en cada sujeto (K_m = constante de Michaelis-Menten (mg/L), V_{MAX} = velocidad máxima de eliminación (mg/h/L)). El procedimiento utilizado fue descripto previamente ⁷ (*) y se aplicó sobre los datos

* Puede solicitarse una copia del programa al Dr. Pietro Fagiolino, suministrando un diskette de 5 1/4".

de concentración-tiempo correspondientes al intervalo 4-12 horas del estudio. El mismo fue aplicado asumiendo que existía fase de eliminación pura en dicho período, teniendo en cuenta que a esos tiempos se superaba en 2,5 veces los tiempos máximos de concentración, en todos los sujetos ⁸. No se utilizaron los datos posteriores a las 12 horas, ya que los niveles son muy inferiores a los K_m reportados previamente ⁵ y se estaría en condiciones de cinética lineal. Si en el ajuste de estos datos se obtenía convergencia a un par K_m , V_{MAX} cuyo K_m era inferior a 50 mg/L, se aceptaba cinética de Michaelis-Menten; de lo contrario se asumía cinética de primer orden, con β obtenida del ajuste multiexponencial.

Para cada sujeto y cada administración se estimó la dosis biodisponible (FD/Vd) mediante dos procedimientos, según se aplicara en el sujeto cinética lineal o no lineal. Para cinética lineal FD/Vd se calculó multiplicando ABC por β obtenido tras la Forma B. Para cinética no lineal FD/Vd se calculó según el programa de cálculo ya mencionado ⁷ para la rutina: administración extravascular dosis única.

Para este cálculo se introdujo en el listado del programa las siguientes sentencias; línea 5265 GOTO 5325, línea 5325 J2= valor de K_m hallado previamente, línea 5465 J3= J3/J1 x valor de V_{MAX} hallado previamente: J1= valor de V_{MAX} .

Análisis estadístico

Los parámetros ABC, C_{max} y FD/Vd se transformaron logarítmicamente, no así T50% ni β .

Luego de verificar normalidad en la distribución de los parámetros transformados o sin transformar (test chi-cuadrado) y similitud de varianzas para las distintas formas farmacéuticas (test F), se ensayaron los siguientes análisis estadísticos: análisis de la varianza (ANOVA) en dos vías, teniendo en cuenta los sujetos, los períodos y los tratamientos como fuente de variación; estimación bayesiana de intervalos de confianza ⁹; test bicaudal de bioequivalencia ¹⁰.

RESULTADOS Y DISCUSION

La Figura 1 muestra los perfiles de niveles plasmáticos medios de teofilina para cada forma farmacéutica.

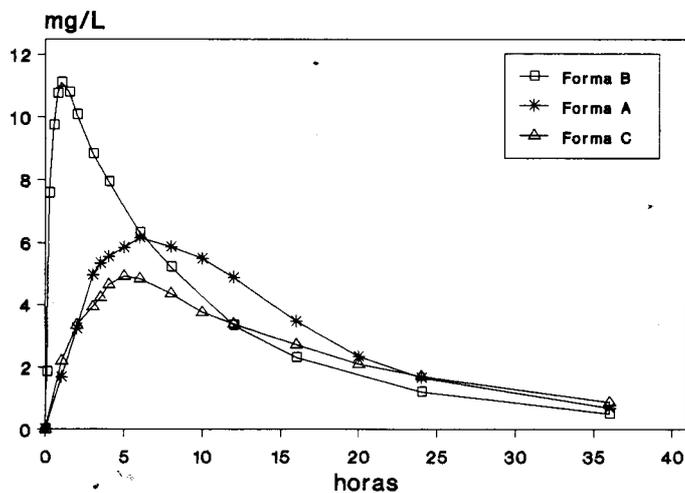


Figura 1. Niveles plasmáticos medios de teofilina en 12 voluntarios.

Las Tablas 2, 3, 4, 5, 6 y 7 resumen los valores de β , ABC, Cmax experimentales, T50%, Km y V_{MAX}, y FD/Vd para los distintos sujetos y formulaciones, respectivamente.

Sujeto	B	A	C
1	0,16	0,13	0,10
2	0,09	0,07	0,03
3	0,09	0,07	0,05
4	0,13	0,12	0,09
5	0,13	0,11	0,05
6	0,08	0,06	0,08
7	0,06	0,13	0,08
8	0,08	0,06	0,06
9	0,07	0,08	0,05
10	0,10	0,11	0,10
11	0,07	0,08	0,04
12	0,10	0,08	0,08
Media (1/h)	0,10	0,09	0,07
Desv. estándar	0,03	0,03	0,02

Tabla 2. Constante de velocidad de fase terminal (β) (A: comprimidos, B: elixir, C: microgránulos).

Sujeto	B	A	C	A/B	A/C
1	71,10	57,44	48,69	0,81	1,18
2	141,65	125,33	139,78	0,88	0,90
3	145,92	185,33	179,78	1,27	1,03
4	89,78	85,62	78,31	0,95	1,09
5	63,03	58,31	56,15	0,93	1,04
6	163,25	154,50	123,25	0,95	1,25
7	61,05	42,00	39,50	0,69	1,06
8	181,67	188,63	141,75	1,04	1,33
9	142,56	131,43	124,57	0,92	1,06
10	115,19	85,10	72,20	0,74	1,18
11	189,76	196,29	141,29	1,03	1,39
12	98,66	94,30	67,80	0,96	1,39
Media (mg.h/L)	121,97	117,02	101,09		
Desv. est.	45,38	54,69	45,75		

Tabla 3. Area bajo la curva (A: comprimidos, B: elixir, C: microgránulos).

Sujeto	B	A	C	A/B	A/C
1	10,00	5,10	4,10	0,51	1,24
2	13,45	6,70	4,70	0,50	1,42
3	12,80	9,60	5,75	0,75	1,67
4	11,95	6,50	5,80	0,54	1,12
5	8,65	4,30	3,10	0,50	1,39
6	13,05	6,70	7,60	0,51	0,88
7	9,10	3,60	2,60	0,28	1,38
8	14,80	9,00	7,20	0,61	1,25
9	9,50	7,60	5,50	0,80	1,38
10	10,40	5,40	4,60	0,52	1,17
11	13,55	8,80	5,70	0,65	1,54
12	11,65	5,50	4,60	0,47	1,20
Media (mg/L)	11,58	6,57	5,10		
Desv. est.	2,01	1,90	1,48		

Tabla 4: Concentración máxima experimental (A: comprimidos, B: elixir, C: microgránulos).

Sujeto	B	A	C	A/B	C/B
1	5,47	9,09	10,35	1,66	1,89
2	8,79	14,92	31,10	1,70	3,54
3	8,29	15,33	29,30	1,85	3,53
4	5,77	11,65	12,70	2,02	2,20
5	6,25	11,08	16,06	1,77	2,57
6	9,42	16,92	13,68	1,80	1,45
7	4,00	9,91	13,25	2,48	3,31
8	7,90	18,41	15,25	2,33	1,93
9	10,97	17,04	20,00	1,55	1,82
10	8,19	13,40	13,44	1,64	1,64
11	11,68	16,69	39,00	1,43	3,33
12	7,38	13,87	14,81	1,88	2,01
Media (h)	7,84	14,02	19,08	1,84	2,44
Desv.est.	2,25	3,05	9,05	0,31	0,78

Tabla 5. Duración de 50% de concentración máxima (T50%) (A: comprimidos, B: elixir, C: microgránulos).

Sujeto	Km (mg/L)	Vmax (mg/L/h)
1	25,50	4,63
3	20,50	2,82
5	31,40	5,53
7	2,950	0,93
8	9,50	1,50
11	4,10	0,91

Tabla 6. Valores de Km y Vmax

Sujeto	B	A	C	A/B	A/C
1	10,82	9,34	8,34	0,86	1,12
2	12,75	11,28	12,58	0,88	0,90
3	15,43	20,97	22,69	1,36	0,92
4	11,67	11,13	10,18	0,95	1,09
5	9,75	9,50	11,59	0,97	0,82
6	13,06	12,36	9,86	0,95	1,25
7	9,85	7,86	8,94	0,80	0,88
8	17,77	19,96	16,75	1,12	1,19
9	9,98	9,20	8,72	0,92	1,06
10	11,52	8,51	7,22	0,74	1,18
11	17,83	18,42	17,59	1,03	1,05
12	9,87	9,43	6,78	0,96	1,39
Media (mg/L)	12,53	12,33	11,77		
Desv.est.	2,98	4,69	4,86		

Tabla 7. Dosis biodisponible (FD/Vd) (A: comprimidos, B: elixir, C: microgránulos).

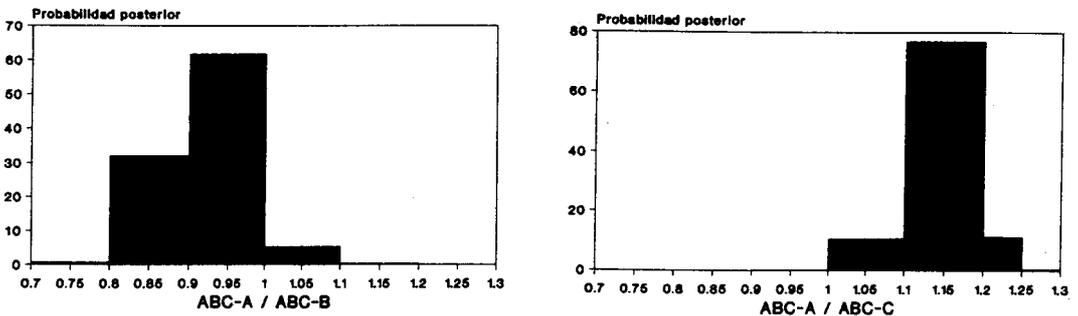


Figura 2. Area bajo la curva (A: comprimidos, B: elixir, C: microgránulos).

Se observa generalmente un decrecimiento de las constantes β en cada sujeto a medida que se prolonga la absorción. Un test t-Student para series apareadas muestra diferencias significativas ($p = 0,01$) entre las Formas B y C. Este hecho confirma la adecuada extrapolación en el cálculo de ABC utilizando β de la Forma B, como más fiel estimación de la constante de velocidad de eliminación en cada sujeto.

La evaluación de los parámetros de biodisponibilidad de la Forma A se realizó por comparación con las Formas B y C, tomadas como referencias, mediante dos análisis independientes. Se analizó por un lado A contra B y por otro lado A contra C.

Un resumen estadístico puede observarse en las Tablas 8 y 9 y en las Figuras 2, 3, 4, y 5, en las cuales se muestran los histogramas de probabilidad de hallar el cociente de las medias poblacionales para los parámetros ABC, Cmax, T50% y FD/Vd, respectivamente.

	ABC	Cmax	FD/Vd	T50%
<i>ANOVA</i>				
<i>Distribución</i>	log-normal	log-normal	log-normal	normal
<i>Fuente Var.</i>				
Sujetos	S	S	S	S
	p < 0,001	p < 0,05	p < 0,001	p < 0,001
Períodos	NS	NS	NS	NS
Tratamientos	NS	S	NS	S
		p < 0,001		p < 0,001
Var. residual	0,0143	0,0206	0,0129	1,25
ln A/B	-0,08 *	-0,60 *	-0,05 *	-
A/B	0,92 **	0,55 **	0,95 **	1,84 *
<i>Test bicaudal</i>				
Rango de A/B equivalencia (95%)	0,8-1,25	0,7-1,43	0,8-1,25	?
Resultado:	equiv.	inequiv.	equiv.	-
CONCLUSION: BIOINEQUIVALENCIA				

Tabla 8. Resumen estadístico: Forma A vs. Forma B (referencia) S: Diferencia significativa. NS: Diferencia no significativa (p=0.05). *: Media aritmética. **: Media geométrica

	ABC	Cmax	FD/Vd	T50%
<i>ANOVA</i>				
<i>Distribución</i>	log-normal	log-normal	log-normal	normal
<i>Fuente Var.</i>				
Sujetos	S	S	S	NS
	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	
Períodos	NS	NS	NS	NS
Tratamientos	S	S	NS	NS
	p < 0,01	p < 0,001		
Var.residual	0,00797	0,0149	0,0138	35,85
ln A/C	0,14*	0,25 *	0,05 *	-
A/C	1,15 **	1,28 **	1,05**	0,82 *
<i>Test bicaudal</i>				
Rango de A/C equivalencia (95%)	0,8-1,25	0,7-1,43	0,8-1,25	?
Resultado:	equiv.	inequiv. leve	equiv.	-
CONCLUSION: BIOINEQUIVALENCIA				

Tabla 9. Resumen estadístico: Forma A vs Forma C (Referencia) S: Diferencias significativas. NS: Diferencias no significativas (p = 0,05). *: Media aritmética. **: Media geométrica

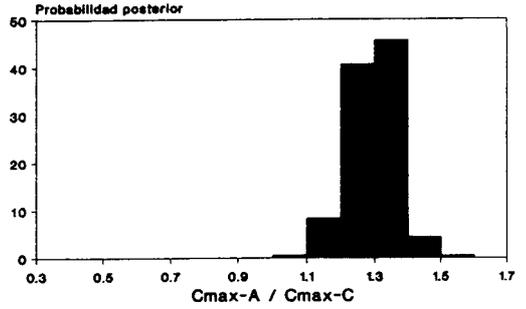
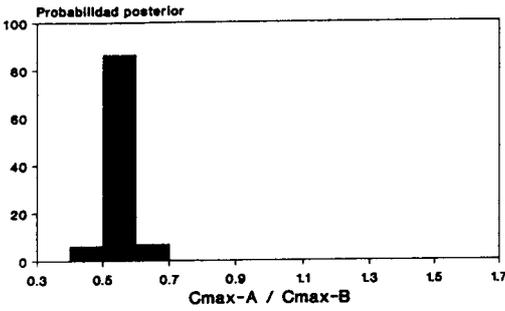


Figura 3. Concentración máxima. (A: comprimidos, B: elixir, C: microgránulos).

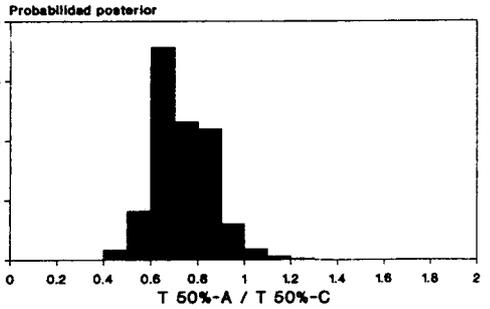
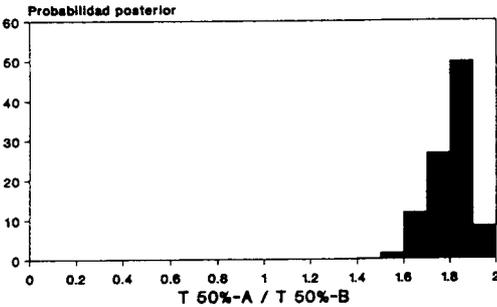


Figura 4. Duración 50% de la concentración máxima (A: comprimidos, B: elixir, C: microgránulos).

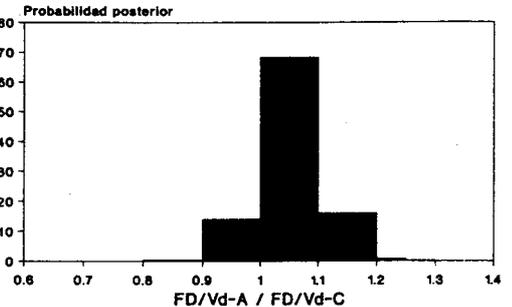
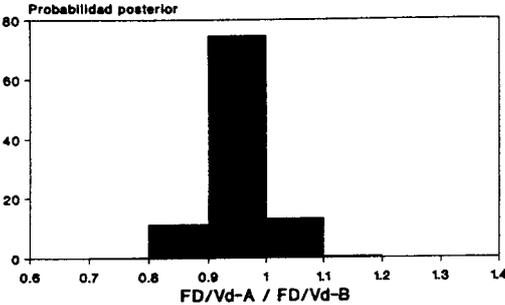


Figura 5. Dosis biodisponible (A: comprimidos, B: elixir, C: microgránulos).

Cantidad absorbida

Del análisis estadístico surge un hecho importante y es que la dispersión de los cocientes para FD/Vd es menor que para ABC (Figuras 2 y 5). Esta observación se debe a que la existencia de cinética de eliminación no lineal contribuye a incrementar el ABC en aquellos sujetos que la presentan, de manera no proporcional a la dosis biodisponible. Cuando las concentraciones se aproximan o superan al valor de Km del sujeto, las mismas se acumulan desproporcionalmente a las dosis absorbidas, lo cual trae aparejado un incremento desproporcional en el ABC.

De manera general, esta situación puede contribuir en algún caso a que se concluya inequivalencia en base al rea bajo la curva, cuando en realidad tal vez exista equivalencia de dosis biodisponible. Esta inequivalencia puede ser concluí-

da de manera involuntaria, según como sean las constantes Km de los sujetos seleccionados para un estudio.

A la inversa, puede quedar enmascarada una inequivalencia real en la dosis biodisponible, cuando sucede al mismo tiempo una inequivalencia en la velocidad de absorción. Este caso es más peligroso, ya que la Cmax sería incapaz de detectar una diferencia en las velocidades de absorción (alta velocidad de absorción con baja dosis biodisponible puede acumular desproporcionalmente las concentraciones y producir un valor alto en Cmax).

Velocidad de absorción

En el presente estudio con teofilina se observa una significativa inequivalencia en Cmax cuando se compara la Forma A con la Forma B y una significativa diferencia cuando se compara la Forma A con la Forma C, aunque la inequivalencia en este caso es leve teniendo en cuenta los márgenes de aceptación de 0,7-1,43¹ para el cociente A/C.

Las diferencias en Cmax eran previsibles para la comparación A vs B, teniendo en cuenta que la Forma B es una solución y la Forma A un comprimido diseñado para liberación prolongada. Estas diferencias son debidas a la velocidad de absorción, lo cual se evidencia claramente al analizar T50%.

Como puede observarse de la Tabla 5, la Forma A incrementa promedialmente un 84% el T50%, lo cual informa de un enlentecimiento moderado de la liberación¹¹.

La velocidad de liberación es también la causa de una leve inequivalencia en Cmax para la comparación A vs C. Según la Tabla 5, el enlentecimiento en la liberación de la Forma C con respecto a la Forma B es más importante que el producido por la Forma A.

Si bien no se han indicado con claridad los límites de aceptación para el cociente de T50%, de la figura 4 puede sugerirse una clara inequivalencia A vs C, ya que el intervalo de confianza del 95% para la relación A/C se ubica entre 0,5 y 1.

Juicio de bioequivalencia

La bioequivalencia encierra el concepto de intercambiabilidad de dos productos farmacéuticos en el curso de un tratamiento con una droga, sin consecuencias terapéuticas. Ello implica poseer similares biodisponibilidades (cantidad y velocidad). Por lo tanto no se puede informar bioequivalencia entre las formas A y C, ya sea considerando, para el cociente de Cmax, un intervalo de confianza del 95% comprendido entre 0,7 - 1,43¹, o del 90% comprendido entre 0,8 - 1,25².

Las Tablas 3, 4, y 7 informan los cocientes Forma A / Forma de Referencia para cada sujeto, útiles para el análisis de la bioequivalencia individual¹², aunque no incursionaremos sobre el tema en este trabajo debido a la no unificación de criterios en este aspecto.

Simulando concentraciones medias de estado estacionario, teniendo en cuenta cinética lineal o cinética no lineal según el caso, y posologías de 300 mg cada 12 horas o cada 24 horas, se ha construido un histograma de probabilidades para el cociente A/C (Fig. 6). Puede verse en dicha figura la dispersión de cociente. Esta dispersión sería mayor si se analizaran las concentraciones máximas en esta-

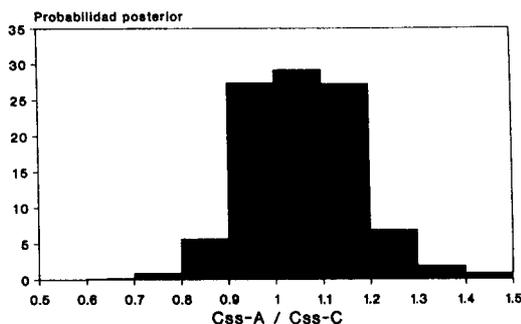


Figura 6. Concentración de estado estacionario. (A: comprimidos, C: microgránulos)

do estacionario, llevando a situaciones de inequivalencias terapéuticas. La causa de esta dispersión de valores se debería al efecto que produce, en los niveles de droga, la cinética no lineal.

La cinética de Michaelis-Menten para teofilina parece incidir en un 50% (6 en 12) de los sujetos que participaron del estudio (Tabla 6). Esto no se puede afirmar con certeza, ya que la mejor manera de verificarlo es tras una administración intravascular y a concentraciones mayores.

Los sujetos 3, 8 y 11 mostraron la más riesgosa combinación de parámetros (FD/Vd, Km, VMAX), a tal punto que una posología de 300 mg cada 12 horas de A o C simula niveles de estado estacionario muy superiores al margen terapéutico (10-20 mg/L). Fue necesario para la simulación en estos sujetos, considerar una posología de 300 mg cada 24 horas. En dichas condiciones el cociente de niveles medios de estado estacionario (A/C) fue de 0,89 (sujeto 3), 1,43 (sujeto 8) y 1,30 (sujeto 11).

CONCLUSIONES

Puede concluirse de este estudio que el producto desarrollado (Forma A) constituye una forma de liberación prolongada que difiere notoriamente de la solución de teofilina (Forma B), pero que promedialmente no puede informarse bioequivalente con la Forma C (microgránulos), debido a diferencias en la velocidad de liberación.

La presencia de cinética de eliminación de Michaelis-Menten aporta un elemento distorsionador en los ensayos de bioequivalencia, que puede ser solucionado mediante un procedimiento apto que permite desligar la influencia de esta cinética en la evaluación de la biodisponibilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Steijnijans V.W., D. Hauschke, J.H.G. Jonkman (1992) *Clin. Pharmacokinet.* **22**: 247-53
2. "In vivo bioequivalence guidances" (1993) From the United States Food and Drug Administration. *Pharmacopeial Forum* **19**: 5793-800
3. Ishizaki T. y M. Kubo (1987) *Ther. Drug Monit.* **9**: 11-20

4. Lejko L.J. (1979) *Clin. Pharmacokinet.* **4**: 449-459
5. Orosa E. , H. Payssé, J. Mérola, P. Fagiolino y L. Piñeyro (1993) *Rev. O.F.I.L.* **3**: 18-21
6. Ruff F. (1980) *Ouest. Med.* **33**: 831-5
7. Fagiolino P. , E. Savio, S. Stareczek (1991) *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet.* Sp.Is. **3** : 485-96
8. Saunders L. y T. Natunen (1976) *J. Pharm. Pharmacol.* **28**: 572-9
9. Fluehler H. , A.P. Grieve, D. Mandallaz, J. Mau y H.A. Moser (1983) *J. Pharm. Sci.* **72**: 1178-81
10. Schuirmann D.J. (1987) *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **15**: 657-80
11. Steijnijans V.W. (1990) *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **15**: 173-81
12. Anderson S. y W.W. Hauck (1990) *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **18**: 259-73