

PL3 BIOEQUIVALENCE STUDY : PRACTICAL APPROACH

รศ.พญ.สุมนา ชมพูทวีป

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Bioequivalence study : เป็นการศึกษาผลิตภัณฑ์ยาตั้งแต่ 2 ตำรับขึ้นไป ที่มีตัวยาสำคัญ (active drug ingredient) ตัวเดียวกัน เมื่อให้ขนาดที่เท่ากันภายใต้เงื่อนไขการทดลองที่เหมือนกัน แล้วพบว่า อัตราเร็วและปริมาณการดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิตของร่างกาย (bioavailability) ไม่แตกต่างกัน จะถือว่าผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีความเท่าเทียมกันทางชีวภาพ หรือมีชีวสมมูลภาพ (bioequivalence) ซึ่งกันและกัน

ในประเทศไทย ปัจจุบันมียาแผนปัจจุบันที่ผลิตในประเทศมากกว่า 20,000 ตำรับ เกือบทั้งหมดเป็นยาเลียนแบบ (me-too drug products) ของผลิตภัณฑ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ (original or innovator products) ถึงแม้ผลิตภัณฑ์เหล่านี้จะได้รับการตรวจวิเคราะห์ว่ามีปริมาณตัวยาสำคัญ (active drugs) ถูกต้องตามเภสัชตำรับกำหนดและมีปริมาณเท่ากัน คือมี pharmaceutical equivalence จริง แต่อาจจะไม่ผลในการรักษาไม่เท่าเทียมกันได้ ดังนั้นได้เริ่มกำหนดให้มีการทดสอบ bioavailability ของผลิตภัณฑ์นั้นเทียบกับผลิตภัณฑ์ต้นแบบ (original หรือ innovator product) ถ้าพบว่ามีความเท่าเทียมกันทางชีวภาพ (bioequivalence) ก็ถือว่าควรให้ผลการรักษาที่เท่าเทียมกันด้วย (therapeutic equivalence) ซึ่งข้อมูลต่างๆ เหล่านี้ จะช่วยให้แพทย์และเภสัชกรตัดสินใจเลือกใช้ยาที่เหมาะสม ที่มีประสิทธิภาพ และมีราคาพอสมควรแก่ผู้ป่วยด้วยความมั่นใจยิ่งขึ้น

สำหรับการศึกษาถึงการเอื้อประโยชน์ (bioavailability) ของยาตำรับต่างๆ เพื่อทดสอบว่าความเท่าเทียมทางชีวภาพ (bioequivalence) กับยาต้นแบบหรือไม่นั้น จะต้องอาศัยความรู้จากหลายสาขาวิชา เช่น เภสัชวิทยาคลินิก (clinical pharmacology), เภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetics), เภสัชกรรมทางชีวภาพ (biopharmaceutics) และทางสถิติ (statistic) โดยเฉพาะความรู้ทางด้านสถิติ จะมีความสำคัญมากในการออกแบบการศึกษาทดลองและการประเมินผล

การศึกษา bioequivalence ในคน มีขั้นตอนในการปฏิบัติดังนี้

1. ผลิตภัณฑ์ยาที่ทดสอบ

ตำรับยาที่จะนำมาศึกษา bioequivalence ในคนนั้น ต้องผ่านการตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติตามเภสัชตำรับในหลอดทดลอง (*in vitro* studies) เพื่อที่จะหาความเท่าเทียมกันทางเภสัชกรรม (pharmaceutical equivalence) ก่อน คือจะต้องมี

1. ศึกษาคุณสมบัติในการกระจายตัวของเม็ดยา (disintegration test)
2. ศึกษาคุณสมบัติในการละลายตัวของเม็ดยา (dissolution test)

3. หาปริมาณของตัวยาในเม็ดยา (content of active ingredient)
4. ศึกษาความสม่ำเสมอของตัวยาในเม็ดยา (content uniformity)

จะเลือกรุ่นผลิต (lot) ที่ดีที่สุดมาศึกษา เช่น รุ่นผลิตที่มีความคงตัว ปริมาณและความสม่ำเสมอของตัวยาสำคัญรวมถึงอัตราการละลายดีที่สุด หลังจากนั้นในการผลิตครั้งต่อๆ มา เรา จะใช้รุ่นผลิต ซึ่งผ่านการทดสอบ bioequivalence ในคนแล้วมาเป็นตัวเปรียบเทียบในการทดสอบ ในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยไม่ต้องทดสอบในคนซ้ำอีก

2. รูปแบบการศึกษา

การศึกษา bioequivalence นี้ เป็นการศึกษาวิจัยในคน โครงร่างในการศึกษานั้น จะต้องผ่านคณะกรรมการจริยธรรม (Ethics committee) ของกระทรวงสาธารณสุข หรือจากมหาวิทยาลัย ก่อนที่จะเริ่มทำการศึกษาได้

การศึกษา bioequivalence นี้ นิยมใช้การทดลองแบบข้าม หรือ crossover design มากที่สุด คืออาสาสมัครคนเดียวกันจะได้รับยาทั้ง 2 ตำรับนี้แต่ต่างเวลากัน ทำให้ลดความแปรผันระหว่างบุคคลออกไป ทำให้ผลของการทดลองมีความถูกต้องแม่นยำกว่า และจำนวนอาสาสมัครใช้น้อยกว่าแบบ parallel design ซึ่งอาสาสมัครจะถูกแบ่งออกเป็นกลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มจะได้ยาต่างตำรับกัน และแต่ละคนได้รับยาเพียงครั้งเดียวเท่านั้น

การกำหนดจำนวนอาสาสมัครในการศึกษานี้ จำเป็นต้องอาศัยความรู้ทางสถิติ อาจจะขอคำแนะนำจากผู้เชี่ยวชาญทางด้านนี้หรือจากตารางทางสถิติ การศึกษา bioequivalence ส่วนใหญ่มักจะใช้จำนวนอาสาสมัครเท่าที่จะหาได้ บางครั้งจำนวน (n) อาจจะน้อยกว่าค่าตามทฤษฎี อย่างไรก็ตามในหลายประเทศ เช่น ประเทศสมาพันธ์ยุโรปและออสเตรเลีย ได้กำหนดจำนวนอาสาสมัครขั้นต่ำที่ใช้ในการศึกษา bioequivalence ไว้ 12 คน

สำหรับเทคนิคในการทดสอบทางสถิติของการศึกษา bioequivalence ได้มีพัฒนาอยู่เสมอ ปัจจุบันตามคำแนะนำขององค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (USFDA) ให้เปรียบเทียบค่า pharmacokinetic parameters ว่าแตกต่างกันหรือไม่นั้น โดยใช้ analysis of variance (ANOVA) for two way crossover design ร่วมกับการพิจารณาพร้อมกับค่า 90% confidence interval

3. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อหาความเข้มข้นของยาในเลือด

เป็นปัญหาที่สำคัญอีกอย่างหนึ่ง ของการศึกษาทาง bioequivalence ที่จะต้องเลือกและพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อหาความเข้มข้นของยาให้เป็นวิธีที่ไว (sensitivity) ① มีความจำเพาะ (specificity) ② มีความแม่นยำ (accuracy) ③ และเที่ยงตรง (precision) ④ ที่ยอมรับได้ นอกจากนั้นมีการควบคุมคุณภาพของการวัด (quality control) ด้วย

4. การคัดเลือกอาสาสมัคร *inclusion criteria*

อาสาสมัครที่มีร่างกายปกติ (healthy volunteers) ควรเป็นเพศชาย ยกเว้นในบางการศึกษาที่ใช้ทดสอบ เช่น ยาคุมกำเนิด ก็ต้องใช้อาสาสมัครหญิง อายุควรอยู่ระหว่าง 18-55 ปี จะต้องได้รับการตรวจร่างกาย (physical examination) และตรวจทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งได้แก่ การตรวจเลือด (complete blood count, blood chemistry) เพื่อดูภาวะซีดจางของร่างกาย ดูการทำงานของตับ ไต ตรวจปัสสาวะ (chest-x-ray) บางการศึกษาอาจจะต้องมีการตรวจปอด หรือ การตรวจคลื่นหัวใจด้วย (EKG)

อาสาสมัครทุกคนจะต้องได้รับการอธิบายถึงวัตถุประสงค์รูปแบบและขั้นตอนของการศึกษาทดลองนี้ รวมทั้งประโยชน์และความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้น โดยทุกคนจะต้องเซ็นใบยินยอม (consent form) ก่อนที่จะเริ่มการศึกษา ซึ่งอาสาสมัครทุกคนมีสิทธิ์จะบอกเลิกการร่วมการทดลองเมื่อใดก็ได้ *good clinical practice (GCP) or record forms.*

5. สถานที่ศึกษา

ควรจะมีห้องพัก (metabolic ward) ที่จะทำการศึกษา มีเตียงหรือที่พักร้อนให้อาสาสมัครได้พักผ่อนขณะที่อยู่ระหว่างในการศึกษา ในห้องที่ศึกษาควรเตรียมเครื่องมือฉุกเฉิน (emergency kit) ไว้ และควรมีแพทย์ผู้รับผิดชอบในการศึกษา เมื่อมีอาการข้างเคียงที่รุนแรงเกิดขึ้น จะได้ดูแลแก้ไขอาสาสมัครได้ *environment ที่เหมาะสม เช่น TV, radio.*

6. วิธีการศึกษา

การศึกษา single dose crossover study *single dose ความแตกต่าง variation for* เป็นการศึกษา bioequivalence ที่นิยมมากที่สุด เนื่องจากสามารถควบคุมการทดลองได้ดีกว่าและค่าใช้จ่ายน้อยกว่าแบบ multiple dose study ในที่นี้จะขอลำถึงแต่ single dose crossover study เท่านั้น

การศึกษาที่ใช้ขนาดเดียว (single dose study) นี้ ควรเลือกขนาดที่ใช้ในการรักษา ส่วนใหญ่จะใช้ขนาด (dose) ที่ระบุไว้ในหนึ่งหน่วย เช่น dose ในหนึ่งเม็ด โดยอาสาสมัครจะได้รับยาที่ต้องการทดสอบ (test) และยาต้นแบบ (reference product) ในขนาดยาหรือ dose ที่เท่ากัน แต่ต่างระยะเวลากัน และวิธีการให้ยาควรเป็น double blind โดยการสุ่ม

ก่อนเริ่มการศึกษาแต่ละช่วง อาสาสมัครควรงดอาหารตั้งแต่หลังเที่ยงคืนก่อนวันทดลอง และงดต่อมาอีกประมาณ 4 ชั่วโมง ภายหลังจากการให้ยาแต่ละครั้ง ซึ่งควรเป็นเวลาเดียวกัน เช่น 7.00-8.00 น. โดยให้ยารับประทานพร้อมน้ำเปล่าประมาณ 100-200 ซีซี ควรพักอยู่ใน metabolic ward เพื่อเจาะเลือดเก็บตัวอย่างเลือดหรือปัสสาวะตามเวลาที่กำหนด *wash out period (5-10 hrs) = งดจาก*

เงื่อนไขการทดลองต่างๆ เช่น อิริยาบถ อาหาร เครื่องดื่ม เวลาการให้ยา การเก็บตัวอย่างเลือดหรือปัสสาวะ หรือการให้ยาอื่นควบคู่กับยาที่ศึกษา จะต้องเป็นแบบเดียวกันในอาสาสมัครแต่ละคน ซึ่งเขียนระบุชัดเจนในระเบียบขั้นตอนของการศึกษา นอกจากนั้นอาสาสมัครจะต้องไม่ดื่มเหล้า สูบบุหรี่หรือได้รับยาอื่นๆ ระหว่างการศึกษาและควรงดสิ่งเหล่านี้อย่างน้อยหนึ่งสัปดาห์ ก่อนเริ่มการทดลอง เพื่อควบคุมปัจจัยภายนอกต่างๆ ที่อาจจะมีผลต่อการศึกษาได้

ในการศึกษาแบบ crossover design นี้ ระยะเวลาห่างที่จะทดสอบยาแต่ละตำรับนั้นมีความสำคัญ คือต้องให้มี washout period ที่ถูกต้องและเพียงพอ คือต้องมีระยะเวลาให้ร่างกายขับยาจากการศึกษาตำรับแรกให้หมดก่อนที่จะให้ยาตำรับต่อไป เพื่อไม่ให้ยาตำรับแรกมีผลต่อการศึกษาของตำรับหลัง คือมี carry over effect ก่อนที่จะให้ยาตำรับต่อไป หลักโดยทั่วไปจะกำหนดช่วงห่างระหว่างการให้ยาประมาณ 5-10 เท่าของค่าครึ่งชีวิต (elimination half-life) ของตัวยา

และในการศึกษา bioequivalence นี้ จะต้องมีการวัดระดับยาในเลือดหรือในปัสสาวะ ดังนั้นการวางแผนการเก็บตัวอย่างเลือดหรือปัสสาวะจึงมีความสำคัญมาก ความถี่ และระยะเวลาของการเก็บตัวอย่างจะต้องเพียงพอ เพื่อให้ได้กราฟของระดับยากับเวลา ที่ให้ได้ plasma drug profile ที่ดีสามารถจะหารายละเอียดของระยะการดูดซึม หรือความเข้มข้นของระดับยา ตลอดจนระยะการขับยาออกจากร่างกายได้

การศึกษา bioequivalence นี้ ค่า pharmacokinetic parameters ที่ใช้มากที่สุด คือ

1. C_{max} (Peak drug concentration) ค่าระดับความเข้มข้นของยาในเลือดสูงสุด
2. T_{max} (Time to peak drug concentration) ค่าเวลาที่ความเข้มข้นของยาในเลือดสูงสุด
3. AUC (Area under the drug concentration - time curve) พื้นที่ใต้เส้นกราฟของระดับยาในเลือดกับเวลา

ค่า C_{max} และ T_{max} จะเป็นตัวบ่งบอกถึงอัตราเร็วในการดูดซึมของยา ขณะที่ AUC จะเกี่ยวข้องกับปริมาณในการดูดซึม

ค่า parameters อื่นๆ ที่อาจจะมีการเปรียบเทียบคือ ค่าคงที่ของอัตราเร็วของการดูดซึม (K_a = absorption rate constant), ค่าคงที่ของอัตราเร็วการขจัดออก (K_e = elimination rate constant), ค่าครึ่งชีวิตของการขจัดยา ($t_{1/2}$ = elimination half-life), ค่า clearance ของตัวยา หรือเมตาบอลิซึม *plasma (is anticoagulant ของมันจะลดลง) ∴ ค่าครึ่งชีวิต*

การเก็บตัวอย่างเลือดระหว่างการให้ยาในแต่ละครั้งควรใช้เวลาอย่างน้อย 3 เท่าของค่าครึ่งชีวิตของตัวยา และเก็บถี่พอที่จะได้ absorption profile ที่ชัดเจน เช่น 1 จุดที่เวลาเริ่มต้น 3-4 จุดในช่วง absorption phase, 1 จุดที่บริเวณ C_{max} และอย่างน้อย 4 จุดในช่วง elimination phase และระยะเวลาต่างๆ ที่จะเก็บตัวอย่างนั้นๆ ควรจะตรงกันระหว่างยาที่ต้องการทดสอบ (test) และยาต้นแบบ (reference products) โดยเฉพาะในการเปรียบเทียบยารับประทาน เพื่อให้การเปรียบเทียบความเข้มข้นที่เวลาต่างๆ สามารถทำได้

วิธีการเก็บตัวอย่างเลือดต้องศึกษาว่าวิธีที่วิเคราะห์นั้น จะใช้ลักษณะเป็นซีรัมหรือพลาสมา เพราะในการที่จะต้องใส่ anticoagulant ในตัวอย่างเลือด อาจจะมีผลต่อยาที่ศึกษาได้ ตัวอย่างเลือดที่เก็บได้นั้นจะต้องมาปั่นแยกเม็ดเลือดออก และเก็บ serum ไว้ในตู้เย็นที่ต่ำกว่า -20°C เพื่อที่จะทำการวิเคราะห์หาระดับยาต่อไป

ถ้าตัวยามีการขับถ่ายในรูปที่ไม่เปลี่ยนแปลงในปัสสาวะ ในปริมาณที่สูงพอ เช่นมากกว่าร้อยละ 30 ของ dose ที่ให้ อาจจะใช้ปริมาณยาสะสมที่ขับออกมาในปัสสาวะ (cumulative amount excreted) เป็นตัวเปรียบเทียบ bioavailability ก็ได้ หรืออาจจะพล็อตกราฟระหว่างอัตราเร็วในการขับยาทางปัสสาวะ (urinary excretion rate) ในช่วงเวลาต่างๆ ก็จะได้กราฟที่มีลักษณะ

คล้ายคลึงกับการพล็อตระหว่างระดับของยาในเลือดกับเวลา เพราะส่วนใหญ่จะมีความสัมพันธ์กัน ในสองวิธีนี้ การเก็บตัวอย่างปัสสาวะอาจใช้วิธีแตกต่างกัน เช่นถ้าวิธี cumulative amount excreted ต้องเก็บตัวอย่างให้ครบและนานพอ โดยทั่วไปจะเก็บนานถึง 7 half-life ของตัวยา แต่วิธี urinary excretion rate อาจเก็บตัวอย่างแค่ 3 half-life ก็อาจเพียงพอ แต่วิธีนี้จะมีความแปรปรวนของข้อมูลมากกว่าการวัดระดับยาสะสมตามวิธีแรก

เมื่อได้ผลของระดับยาทางห้องปฏิบัติการแล้ว จะต้องมีการประเมินผลของการศึกษา bioequivalence ต่อไป

การศึกษานำร่อง (Preliminary or Pilot study) ก่อนการศึกษาจริง ๆ บางครั้งอาจจะต้องมีการศึกษาในอาสาสมัครเพียง 2-3 คนก่อน เพื่อให้ทราบถึงแนวทางในการเก็บตัวอย่างเลือดหรือปัสสาวะเพื่อให้ได้ลักษณะ profile ของยาในเลือดให้ใกล้เคียงความเป็นจริง และยังเป็นการตรวจสอบและพัฒนาวิธีวิเคราะห์ให้ดียิ่งขึ้น และยังให้ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับความแปรปรวนของ parameters ต่าง ๆ ที่จะศึกษา สามารถนำไปใช้ในการคำนวณหาจำนวนอาสาสมัครที่เหมาะสมได้

เอกสารอ้างอิง

1. Guidelines for Bioavailability/Bioequivalence studies. Working group on the standardization of the General Guidelines for Bioavailability/Bioequivalence studies. Drug Analysis Division. Department of Medical Sciences. Ministry of Public Health. Thailand. August 1992.
2. ดร.ภาคภูมิ เต็งอันทวย การวางแผนการทดลองในการศึกษา Bioavailability/Bioequivalence. การสัมมนาเรื่องแนวทางการประเมินประสิทธิภาพยาโดยการศึกษาศึกษา Bioavailability ณ โรงแรมเอเชีย ราชเทวี กรุงเทพฯ 7 สิงหาคม 2535.
3. ดร.เรณู โกยสุโข การประเมินประสิทธิภาพในการรักษาของยาโดยการศึกษาศึกษา Bioavailability. การสัมมนาเรื่องแนวทางการประเมินประสิทธิภาพยาโดยการศึกษาศึกษา Bioavailability ณ โรงแรมเอเชีย ราชเทวี กรุงเทพฯ 7 สิงหาคม 2535.
4. International consensus statement on bioavailability/bioequivalence testing. Drug Information Association Workshop on "Bioavailability and Bioequivalence of Medical Products : Harmonization of International Testing Requirements and Standards." Barcelona, Spain March, 1991.

Pilot study

- sample collected
- assay method
- variation : sample size