

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS
MÉDICAS

“Comparação farmacocinética de duas formulações de
alfapeginterferona em voluntários sadios”

MARISA BOFF COSTA

Porto Alegre, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL FACULDADE
DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS
MÉDICAS

“Comparação farmacocinética de duas formulações de
alfapeginterferona em voluntários saudáveis”

Orientador: Paulo Dornelles Picon

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências
Médicas, UFRGS, como requisito para obtenção do título de Mestre

Porto Alegre, 2012

CIP - Catalogação na Publicação

Boff Costa, Marisa

Comparação farmacocinética de duas formulações de
alfapéginterferona em voluntários sadios / Marisa
Boff Costa. -- 2012.
121 f.

Orientador: Paulo Dornelles Picon.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2012.

1. Farmacocinética. 2. Interferon. I. Dornelles
Picon, Paulo, orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

À meus queridos pais, pelo exemplo de vida, luta e caráter que me proporcionaram, levando-me a desafiar o destino e concluir mais esta etapa. À vocês dedico esta conquista. Às minhas amadas irmãs, pela compreensão, apoio e união que representamos. Aos meus cunhados, pelo carinho. Ao pequeno Gustavo, pela simplicidade com que conduz questões que a maturidade insiste em complicar.

A todos que acreditaram e transmitiram o desejo de concretizar esta caminhada.

A Deus pela inspiração.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Professor Doutor Paulo Dornelles Picon**, por acreditar e confiar no meu trabalho. Pela humildade e respeito que ensina seus alunos. Pelos exemplos de cidadania, ética e profissionalismo. Pela garra que conduz os seus projetos pensando sempre no bem estar da população brasileira.

À equipe NUCLIMED que demonstrou acima de tudo ser uma equipe competente e sólida. Aos colegas Guilherme Becker Sander, Indara Carmanim Saccilotto, Amanda Quevedo, Daiana Gomes, Maria Julia Benites, Laura De Bona e Tobias Milbradt pelo comprometimento demonstrado na etapa de execução deste estudo.

Aos colegas Cubanos, Hugo Nodarse, Rolando Paez e Pedro Lopes Saura por tudo o que nos ensinaram durante a condução deste estudo. Pela dedicação e seriedade que conduziram o tema. Pelo companheirismo, humildade e respeito ao próximo. Exemplos estes, que me fizeram crescer profissionalmente e pessoalmente.

À equipe de Bio-Manguinhos/FioCruz por proporcionar maior conhecimento sobre a pesquisa clínica.

A todos, muito obrigada.

"Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça."

(Cora Coralina)

RESUMO

Introdução: O processo de peguilação consiste de um método de modificação da estrutura proteica com o propósito de minimizar muitas das limitações que estão associadas às proteínas terapêuticas. A peguilação da alfainterferona representou vantagem ao permitir solucionar problemas desta formulação com igual ou maior eficácia que os interferons (INF) não peguilados. Uma absorção mais lenta tende a reduzir o C_{max} e com isso pode haver redução da intensidade dos eventos adversos. Com uma velocidade de eliminação mais lenta, garantimos a conservação de concentrações inibitórias da replicação viral ao longo do tempo. O incremento significativo no tempo de permanência da molécula no organismo justifica a possibilidade de administração semanal do produto. **Objetivo:** Comparar o comportamento farmacocinético de duas formulações de alfapeginterferona, denominadas como Formulação A (alfapeginterferona 2a de 40 kDa) e Formulação B (alfapeginterferona 2b de 48 kDa). **Métodos:** Realizou-se um estudo de fase I, aleatório, cruzado, duplo cego e unicêntrico incluindo 31 voluntários do sexo masculino, sadios, com idade entre 19 e 35 anos. Estes sujeitos de pesquisa foram estudados em duas etapas com duração de 14 dias consecutivos cada uma e com cinco semanas de “wash-out” entre cada administração subcutânea (180 µg de um dos produtos). A variável principal foi a avaliação da concentração sérica de alfapeginterferona, determinada por ensaio imunoenzimático em 15 coletas durante o tempo do estudo. **Resultados:** Não foram observadas diferenças entre as duas formulações para as medidas de magnitude (C_{max} ($p=0,318$), $ASC_{(0-336)}$ ($p=0,464$)) nem de absorção ($CAV_{(0-336)}$ ($p=0,384$), MIT ($p=0,299$)). Os parâmetros farmacocinéticos de tempo apresentaram resultados significativamente maiores para a Formulação B em comparação a Formulação A (T_{max} : 73 vs 54 horas ($p=0,0010$);

MRT₍₀₋₃₃₆₎: 133 vs 115 horas (p=0,0324); Ke: 0,008 vs 0,009 horas⁽⁻¹⁾ (p=0,0153); t_{1/2}: 192 vs 118 horas (p=0,0218), respectivamente). **Conclusão:** Conclui-se que a Formulação B apresentou os perfis farmacocinéticos de magnitude semelhantes aos da Formulação A e diferentes quanto aos parâmetros de tempo. Mais estudos são necessários para entendermos as repercussões clínicas destes achados.

Palavras-Chave:

Farmacocinética, alfapeginterferona, Fase I

Abstract

Background: The pegylation process is a method to modify the protein structure in order to minimize many of the limitations associated with therapeutic proteins. The pegylation of interferon (IFN) alpha represented advantage in allowing to solve the problems this formulation. A slower absorption tends to reduce C_{max} and so the intensity of the adverse events can be reduced. The slower rate of elimination ensures the retention of concentrations that are able to inhibit the viral replication over time up to the point of being able to delay the administration to a weekly application with equally effectiveness than the standard IFN. The significant increase in the permanence time of the molecule in the body justifies the possibility of a weekly administration of the product. **Objectives:** Compared the pharmacokinetic properties of two formulations of peginterferon: the formulation A - peginterferon alpha-2a of 40 kDa, and formulation B - peginterferon alpha-2b of 48 kDa. **Methods:** This randomized double-blind crossover phase I study, conducted in a single center with 31 healthy male volunteers aged 19 to 35 years in two phases of 14 consecutive days each and a five-week wash-out period between each subcutaneous administration of 180 μ g of one of the formulations. The main variable was the serum peginterferon concentrations in 15 samples collected during the study using an enzyme immunoassay (EIA). **Results:** There were no differences between the two formulations in magnitude parameters (C_{max} ($p=0,318$), $ASC_{(0-336)}$ ($p=0,464$)) or absorption parameters ($CAV_{(0-336)}$ ($p=0,384$), MAT ($p=0,299$)). The analysis of time parameters revealed significantly longer times for formulation B than for formulation A (T_{max} : 73 vs. 54 h ($p=0,0010$); MRT : 133 vs. 115 h ($p=0,0324$); ke : 0.008 vs. 0.009 h^{-1})

($p=0,0153$); $t_{1/2}$: 192 vs. 118 h ($p=0,0218$)). **Conclusion:** The pharmacokinetic profile of formulation B were similar to those of formulation A in what refers to magnitude parameters and different for time parameters. Further studies should be conducted to evaluate the clinical implications of these findings.

Keywords:

Pharmacokinetics, alfapeginterferon, Phase I

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características demográficas antropológicas dos voluntários do estudo.	61
Tabela 2: Estatística dos parâmetros farmacocinéticos médios.....	63
Tabela 3: Análise Não Compartimental (Modelo Estatístico) das medidas farmacocinéticas das Formulações A e B	64
Tabela 4: Resultado da Análise ANOVA para o efeito de cada fonte de variação	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Curvas de concentração plasmática (pg/ml) média X tempo (horas) das Formulações A e B	62
Figura 2: Curvas de concentração plasmática (pg/ml) média X tempo (horas) das Formulações A e B em escala logarítmica	62

LISTA DE ABREVIATURA

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CIGB: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

CONEP: Comitê Nacional de Ética em Pesquisa

EIE: Ensaio Imunoenzimático ELISA

2'5'OAS: 2'5 Oligoadenilato sintetase

β -2MG: Beta 2 microglobulina

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

IFN: Interferona

I.V: Via intravenosa

I.M: Via intramuscular

FDA: *Food and Drug Administration*

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

NUCLIMED: Núcleo de Investigação em Medicamentos

PEG: Polietilenoglicol

PCR: Reação em cadeia da polimerase

RVS: Resposta virológica sustentada

HCV: Vírus da Hepatite C

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UFRGS: Universidade Federal de Rio Grande do Sul

UI: Unidade Internacional

DP: Desvio Padrão

CV: Coeficiente de Variação

IC: Intervalo de confiança

ANOVA: Análise de Variância

T_{max} : Tempo necessário para que ocorra o C_{max}

C_{max} : Máxima concentração plasmática observada ao longo do tempo

$ASC_{(0-336)}$: Área sob a curva de concentração sanguínea de zero ao instante t , onde t é o tempo relativo à última concentração determinada experimentalmente

$ASC_{(0-inf)}$: Área sob a curva de concentração de zero ao tempo infinito

K_e : Constante de eliminação

$T_{1/2}$: Tempo de meia vida de eliminação do fármaco

MRT: Tempo médio de residência

VD: Volume de distribuição

CL: Depuração plasmática

HVD: Valor de duração da concentração média

MAT: Tempo médio de trânsito desde o local de administração até a circulação sistêmica

CAV: Medida de absorção com maior valor de tempo e concentração máxima

AUEC: Área abaixo da curva do efeito/parâmetro

$R_{máx}$: valor da resposta máxima

$T(R_{máx})$: tempo para atingir a resposta máxima.

SUMÁRIO

RESUMO	7
Abstract	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE ABREVIATURA	13
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 Farmacocinética	23
3 MARCO TEÓRICO	33
4 JUSTIFICATIVA	36
5 OBJETIVOS	37
5.1 Objetivo geral	37
5.2 Objetivos específicos	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
6 ARTIGO	46
ANEXOS	105

1 INTRODUÇÃO

Estudar o perfil farmacocinético de um medicamento é uma etapa importante para compreender o comportamento e a ação do fármaco no organismo. Várias características influenciam no comportamento cinético do medicamento, portanto as características físico-químicas do ingrediente farmacêutico ativo, a forma de dosagem e a via de administração são determinantes importantes do comportamento *in vivo*. Praticamente todos os grupos de fármacos disponíveis foram objeto de tentativas para modificar algumas de suas características, tendo como objetivo produzir um produto estável que, após administração, proporcione a resposta terapêutica desejada no paciente.

Alguns medicamentos apresentam um perfil farmacocinético inadequado do ponto de vista clínico, uma vez que flutuações no seu perfil de concentração sérica por tempo não são desejáveis, em especial para grupo de fármacos antimicrobianos ou antivirais⁽¹⁾. Uma das alternativas mais exploradas nos últimos anos para melhorar a eficácia terapêutica foi a do controle da liberação do fármaco com o objetivo de prolongar sua permanência no organismo. Nesta tendência encontram-se em desenvolvimento vários sistemas que alteram a liberação de fármacos injetáveis com a intenção de melhorar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas desses agentes terapêuticos. Possíveis vantagens dos novos mecanismos de liberação incluem um aumento na duração de sua atividade farmacológica, diminuição dos efeitos adversos, melhora na adesão do paciente ao tratamento e na sua qualidade de vida.

O foco principal em todas essas alterações é melhorar a biodisponibilidade do medicamento. A biodisponibilidade pode diferir de um medicamento para outro contendo o mesmo fármaco e mesma via de administração. Tais alterações podem representar diferença de eficácia terapêutica entre os produtos. Em outras palavras, a natureza da molécula do fármaco, formulação, apresentação e a via de administração podem determinar se um medicamento administrado é terapeuticamente eficaz, tóxico, ou não tem efeito aparente⁽²⁾.

O comportamento farmacocinético de uma molécula de fármaco de natureza proteica unida a uma estrutura química que pertence à família do polietilenglicol (PEG) é discutido neste estudo. O processo de peguilação consiste de um método de modificação da estrutura proteica com o propósito de minimizar muitas das limitações que estão associadas às proteínas terapêuticas (ex. meia-vida curta, imunogenicidade, baixa estabilidade)⁽³⁾. Como resultado se consegue um incremento no tempo de permanência do medicamento no organismo. Este processo de união de uma proteína com um dos PEG recebe o nome de peguilação e o novo produto originado se denomina derivado peguilado.

As moléculas peguiladas carecem de atividade farmacológica e se mostram muito aptas para modificações importantes em várias partes de sua estrutura⁽³⁾. Além disto, oferecem a possibilidade de união linear ou ramificada de várias moléculas a diferentes lugares da estrutura de uma mesma proteína, aspectos que permitem melhorar notavelmente as possibilidades de utilização terapêutica. Sabe-se, porém, que dependendo do tamanho e a natureza da porção do polietilenoglicol (PEG) as variações dos parâmetros

farmacocinéticos podem alterar significativamente. Geralmente, quanto maior é o tamanho do PEG utilizado para se fixar a um fármaco, mais lenta é a velocidade de eliminação do fármaco do organismo. Este fato faz supor a manutenção de concentrações plasmáticas do fármaco peguilado durante mais tempo, ou seja, possibilidade de administrar o fármaco em intervalos mais prolongados. Por outro lado, quanto maior é o número de ligações de uma molécula com PEG, maior será a possibilidade de que existam interferências na atividade farmacológica. Conseguir o equilíbrio adequado é, portanto, primordial para atingir benefícios terapêuticos.

Até hoje, a experiência acumulada com os diferentes derivados peguilados estudados demonstraram que todos eles, em comparação ao fármaco não peguilado, apresentam maior estabilidade física e térmica⁽⁴⁻⁶⁾, menor susceptibilidade à degradação enzimática⁽⁷⁾, aumento da solubilidade^(8, 9), redução da depuração plasmática com o correspondente aumento da meia-vida de eliminação⁽¹⁰⁻¹³⁾, redução da imunogenicidade⁽¹⁴⁻¹⁷⁾ e da antigenicidade e por último, melhora do perfil de toxicidade⁽¹⁸⁾. Esses efeitos são devidos às modificações em relação ao fármaco original, conferindo diferentes propriedades físico-químicas que incluem mudanças de conformação, interferências estéricas, mudanças nas propriedades de fixação eletrostática, incremento da lipofilia, entre outras. Estas mudanças implicam em profundas alterações do comportamento do derivado peguilado, que se concentram no comportamento farmacocinético.

A presença de uma ligação covalente na fixação do PEG ao fármaco gera diversas consequências. Por um lado, produz diminuição da velocidade de absorção do fármaco em nível do tecido muscular ou subcutâneo, relacionado

diretamente com o tamanho da molécula. Esta diminuição da velocidade de absorção, tal como foi especificada, resulta que a absorção do fármaco predomine sobre sua eliminação, geralmente muito rápida, o que garante um maior tempo de permanência do derivado peguilado no organismo.

O tamanho da molécula é também um fator determinante da velocidade de difusão tissular e transporte sanguíneo. Os derivados peguilados de menor tamanho vão circular livremente no plasma com difusão livre ao espaço extracelular⁽¹⁹⁾. Os derivados peguilados de tamanho maior terão dificuldades para atravessar as paredes capilares, serão captados no sangue pelas células do sistema retículo-endotelial e, por sua vez, no seu interior, serão transportados com preferência aos órgãos ricos neste tipo de células, entre eles o fígado e o tecido linfático.

Por último, a peguilação influi de forma decisiva na eliminação, porque a macroestrutura peguilada vai ser eliminada por filtração glomerular mais lenta, velocidade que será menor quanto maior seja o tamanho do peguilado, a ponto de incrementar formas compensatórias de eliminação como a captação hepática e provavelmente a excreção biliar. Esta circunstância também contribui para explicar o maior tempo de permanência de concentrações plasmáticas e tissulares dos derivados peguilados, que será proporcional ao tamanho do PEG utilizado.

Um fármaco peguilado possibilita a redução no número de aplicações. Este fato torna-se muito atrativo para fármacos que apresentam uma meia-vida de eliminação reduzida e que, portanto, necessitam de administrações em intervalos curtos. Outra vantagem da peguilação fica evidente ao reduzir a possível toxicidade associada a picos elevados de níveis plasmáticos.

Abrangendo esta tecnologia para o desenvolvimento de medicamentos com perfis mais apropriados para o tratamento de doenças virais, destaca-se a prevalência do vírus da hepatite C (HCV) como uma das principais causas de doença hepática crônica em todo o mundo. No Brasil ocorrem principalmente os genótipos 1, 2 e 3, e apresentam-se na maioria dos casos, de forma assintomática, podendo ocorrer sintomas inespecíficos como dores musculares, cansaço e icterícia. É uma doença que atinge 3,0% da população mundial⁽²⁰⁾, com desfechos relevantes em termos de morbi-mortalidade, podendo evoluir para cirrose, insuficiência hepática terminal e carcinoma hepatocelular. O Ministério da Saúde (MS) do Brasil traçou o perfil epidemiológico desta doença levando em considerações as capitais brasileiras e constatou que a endemicidade da infecção pelo vírus HCV é baixa, com prevalência de 1,56% na faixa etária de 20 a 69 anos de idade. Além disto, neste levantamento, pôde-se observar que a maior pobreza e aumento da idade estão relacionados à maior positividade para o anti-HCV⁽²¹⁾.

Aprovado em novembro de 2000 pela *Food and Drug Administration* (FDA) para que fosse utilizada no tratamento de pacientes com hepatite C crônica, a monoterapia com INF peguilado obteve 40% de resposta virológica sustentada. Neste mesmo ano foi aprovada sua combinação com ribavirina, elevando a mesma até 61%⁽²²⁻²⁴⁾. O IFN peguilado também está indicado para o tratamento da hepatite B crônica⁽²⁵⁾. Os interferons atuam ligando-se aos receptores específicos sobre a superfície da célula infectada, iniciando um caminho complexo de sinalização intracelular e rápida ativação da transcrição do gene. Os genes estimulados pelo interferon modulam muitos efeitos

biológicos, incluindo a inibição da replicação viral em células infectadas, inibição da proliferação celular e imunomodulação⁽²⁶⁾.

A administração pela via intramuscular ou subcutânea da forma convencional implica uma absorção muito rápida, atingindo pico de níveis séricos entre 7 a 12 horas, uma ampla distribuição e uma elevada depuração plasmática, que condiciona uma meia-vida de eliminação muito curta, de 4 a 16 horas, de forma que em 24 horas após a administração encontra-se pouco ou nenhum IFN circulante. Este perfil farmacocinético justifica a existência de oscilações rápidas e importantes das concentrações de alfainterferona, que foram associadas com os sintomas pseudo-gripais típicos da administração deste fármaco e, além disso, com um tempo de eficácia reduzido, o que permitiria pelo menos enquanto o intervalo de administração não estivesse ajustado, a replicação do vírus nos períodos em que as concentrações do produto fossem reduzidas⁽²⁷⁾.

A peguilação da alfainterferona permite resolver os grandes problemas das formulações de INF não peguilação. Modificando a farmacocinética através de uma liberação mais lenta, redução do volume de distribuição e a redução da depuração do produto, é possível aumentar significativamente o tempo de residência da molécula no organismo, algo que justifica a administração semanal do INF.

Atualmente, são comercializadas duas versões de alfapeginterferona. A alfapeginterferona 2b se caracteriza por uma ligação ao PEG com massa molecular de 12 kDa e uma estrutura linear simples, onde as ligações de união entre ambas as moléculas é do tipo éster, situado sobre um resíduo de histidina. Sua eliminação é por via renal⁽²⁸⁾. A alfapeginterferona 2a é maior

especialmente e se distingue por duas cadeias ramificadas de PEG, cada uma de 20 kDa de massa molecular. A ligação covalente, envolvendo um resíduo lisina na união ao PEG, faz com que seja mais resistente e capaz de ser apresentado em forma líquida. A dose é de 180 µg e a notável redução no volume de distribuição que atinge logo após a administração, permite-lhe empregar essa dose de maneira uniforme, sem precisar ajuste ao peso corporal.

O *Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología* (CIGB) de La Havana, Cuba apresenta desde 1981, entre seus produtos líderes, o IFN alfa-2b humano recombinante. Neste centro, foi implementada a tecnologia necessária para o processo de peguilação de proteínas, empregando-se técnicas que permitiram a purificação de um conjugado derivado da alfainterferona, conseguindo o isolamento de um candidato monopeguilado com mais de 95% de pureza. Este conjugado foi obtido utilizando um PEG ramificado de 48 kDa que demonstrou uma adequada estabilidade térmica e menos susceptibilidade à degradação por proteases quando comparado com a proteína sem modificação⁽²⁹⁾. Os estudos pré-clínicos, realizados com a Formulação B, demonstraram um tempo de meia-vida no sangue significativamente maior do que IFN não peguilado em estudos farmacocinéticos em animais. Após obtenção destes resultados, decidiu-se realizar estudo clínico de fase I para avaliar seu comportamento farmacocinético em comparação com o similar alfapeginterferona 2a, disponível comercialmente.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A fim de revisar a literatura sobre o perfil farmacocinético da alfapeginterferona 2a e 2b foi realizada busca na base de dados Medline/Pubmed, utilizando as seguintes palavras-chaves: *pharmacokinetics AND peginterferon AND interferon*. Foram utilizados como limites de busca, estudos em humanos, ensaios clínicos, ensaios clínicos randomizados e metanálises. A busca foi feita sem limite de data, sendo localizados 55 artigos no Medline/Pubmed. Após análise, foram excluídos aqueles que apresentavam dados de associações de outros fármacos ao tratamento padrão (INF + ribavirina), estudos com pacientes co-infectados pelo vírus HIV, estudos cujo objetivo foi avaliar a progressão da doença, estudos de cinética viral, manejo dos eventos adversos e estudos de custo efetividade. Dessa forma 11 artigos foram selecionados e serão descritos a seguir.

2.1 Farmacocinética

Algranati NE, Sy S, Modi M. (1999)⁽³⁰⁾

Num estudo realizado com 10 voluntários sadios, aos quais foi administrada uma dose única de 180 µg por via subcutânea da alfapeginterferona 2a, os resultados demonstraram que a concentração plasmática máxima (C_{max}) atingida foi de 14.2 (ng/mL) em tempo máximo de 80 horas (T_{max}), sendo que em 3 a 8 horas após administração pode-se detectar concentrações séricas substanciais de alfainterferona. A peguilação reduziu a depuração (CL) em 100 vezes e aumentou o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de 9 horas (DP+/-6) para 77 horas (DP+/-45). Trinta e dois por cento da dose

administrada foi absorvida nas primeiras 24 horas, aumentando de forma progressiva até atingir 80% após sete dias da administração.

Gupta SK, Pittenger AL, Swan SK, Marbury TC, Tobillo E, Batra V, Sack M, Glue P, Jacobs S, Afrime M. (2002)⁽³¹⁾

Estudo avaliou a farmacocinética e segurança da alfapeginterferona 2b (PEG-Intron[®]) após administração subcutânea de dose única em 26 indivíduos com função renal normal, pacientes com insuficiência renal crônica e pacientes em hemodiálise. As avaliações de farmacocinética e de segurança foram realizadas em até 168 horas após a dose. Todos os sujeitos relataram pelo menos um evento adverso comum aos pacientes que fazem uso deste fármaco (por exemplo, sintomas gripais e dor de cabeça). A administração de dose única PEG-Intron[®] em voluntários com função renal normal e insuficiência renal crônica foi segura e bem tolerada. Em pacientes com $CL < 30 \text{ ml/min}$, os valores de C_{max} e ASC aumentaram 90% e a meia-vida aumentou até 40% em comparação ao grupo controle. Com base nessa relação, estima-se que a depuração renal seja responsável por menos da metade da depuração total. Pacientes em hemodiálise não sofreram alteração na depuração do PEG-Intron[®].

Samir K. Gupta, Suzanne K. Swan, Thomas Marbury, William Smith, Sherwyn Schwartz, Karen Kolz, David L. Cutler. (2007)⁽³²⁾

Estudo avaliou o comportamento farmacocinético da alfapeginterferona 2b em indivíduos com função renal normal ($n=6$) e insuficiência renal de grau moderado ($n=8$) e grave ($n=7$) que receberam aplicações semanais (alfapeginterferona 2b - $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$) durante 4 semanas. Foram observadas diferenças significativas nos valores dos parâmetros ASC e C_{max} de pacientes

com disfunção renal grave em comparação com aqueles que tinham função renal normal ($p < 0,05$). A concentração máxima alcançada foi quase o dobro em pacientes com insuficiência renal grave em comparação com pacientes com função renal normal. A ASC aumentou 30% em pacientes com insuficiência renal moderada e 120% em pacientes com insuficiência renal grave. O tempo de meia-vida aumentou em pacientes que apresentavam comprometimento renal, passando de 51,5 horas (pacientes com função renal normal) para aproximadamente 65 horas (pacientes com insuficiência renal moderada e grave).

Bruno R, Sacchi P, Cima S, Maiocchi L, Novati S, Filice G, Faggioli S. (2012)⁽³³⁾

Revisão publicada em 2012 apresentou dados de estudos com alfapeginterferona 2a conjugada a uma cadeia de PEG ramificado de tamanho 40 kDa covalentemente ligado a resíduos de lisina e a alfapeginterferona 2b conjugada covalentemente a uma cadeia linear de PEG 12 kDa através de uma ligação uretano instável. Os parâmetros farmacocinéticos dos dois medicamentos demonstraram semelhanças. As concentrações alcançaram seu pico máximo entre 15 e 44 horas após administração e mantiveram sustentadas por 48-72 horas. Alfapeginterferona 2a apresenta absorção mais lenta do que alfapeginterferona 2b, o que caracteriza o prolongamento da meia-vida (50 horas). Além disso, apresentou menor volume de distribuição (8-12 Litros) e menor depuração (94mL/h) o que evidencia as diferenças no perfil farmacocinético dependente de tempo em relação ao INF não peguilado. As concentrações máximas são alcançadas após cerca de 80 horas, e são sustentados por até 168 horas. A meia-vida longa e distribuição restrita da

alfapeginterferona 2a indicam que esse fármaco pode ser administrado numa dose fixa semanal.

Bruno R, Sacchi P, C. Scagnolari, F. Torriani, L. Maiocchi, S. Patruno, F. Bellomi, G. Filice, G. Antonelli (2007)⁽³⁴⁾

Estudo clínico, randomizado incluindo 20 voluntários com Hepatite C crônica, comparou a farmacocinética e farmacodinâmica da alfapeginterferona 2a (n=10 / dose 180 µg) e alfapeginterferona 2b (n=10 / dose 1,0 µg/kg) uma vez por semana. A atividade enzimática da 2'5'OAS, os níveis de neopterinina e β-2MG foram medidos no início e em 24, 48, 120 e 168 horas e não apresentaram diferença significativa entre grupos em nenhuma das medidas. Também não houve correlação significativa entre a área abaixo da curva da concentração sérica de alfapeginterferona e as concentrações por tempo de ambas as enzimas. Apesar das diferenças farmacocinéticas entre alfapeginterferona 2a e 2b, os perfis farmacodinâmicos das duas formulações demonstraram ser comparáveis.

Idrian García-García, Carlos A González-Delgado, Carmen M Valenzuela-Silva, Alina Díaz-Machado, Marisol Cruz-Díaz, Hugo Nodarse-Cuní, Orlando Pérez-Pérez, Cimara H Bermúdez-Badell, Joel Ferrero-Bibilonia, Rolando Páez-Meireles, Iraldo Bello-Rivero, Fidel R Castro-Odio, Pedro A López-Saura (2010)⁽³⁵⁾

Um estudo clínico de fase I randomizado, cruzado, duplo-cego com 16 voluntários sadios do sexo masculino, realizado em Cuba, comparou a farmacocinética e farmacodinâmica do produto de referência, Pegasys® (alfapeginterferona 2a) e o PEG-Heberon (alfapeginterferona 2a) formulação peguilada de Cuba, ambas com 40 kDa. Os produtos foram administrados na

dose de 180 µg por via subcutânea em ambos os grupos. Apesar de apresentar uma variabilidade alta, a média dos parâmetros foi muito próxima (em todos os casos $p > 0,05$). A tabela a seguir apresenta os principais resultados encontrados neste estudo:

Farmacocinética			
Parâmetro	Pegasys® N = 16	PEG-Heberon N = 16	p-valor
T _{máx} * (h)	48 ± 24	48 ± 48	0.80
MAT* (h)	33.0 ± 13.2	29.1 ± 14.0	0.26
MRT* (h)	135 ± 43	123 ± 41	0.38
Ke* (h ⁻¹)	0.011 ± 0.004	0.014 ± 0.008	0.38
Farmacodinâmica			
Neopterina			
AUEC* (ng.h/mL)	500 ± 332	474 ± 257	0.75
R _{máx} * (ng/mL)	3.6 ± 1.9	3.8 ± 2.1	0.79
T(R _{máx})* (h)	48 ± 24	48 ± 24	0.19
β-2MG			
AUEC* (µg.h/mL)	211 ± 145	190 ± 95	0.50
R _{máx} * (µg/mL)	1.2 ± 0.5	1.2 ± 0.5	0.99
T(R _{máx})* (h)	72 ± 72	72 ± 24	0.10

*T_{máx}, tempo máximo necessário para atingir concentração máxima; MAT, tempo médio de trânsito do local de administração até a circulação sistêmica; MRT, medida do tempo médio em que o fármaco permanece no sangue; Ke, constante de eliminação; AUEC, área abaixo da curva do efeito, R_{máx}, valor da resposta máxima; T(R_{máx}), tempo para atingir a resposta máxima;

O perfil farmacocinético de ambas as moléculas peguiladas refletiram em curvas muito semelhantes, levando os autores a concluir que ambas as

formulações são totalmente comparáveis nos perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos e na segurança das formulações.

Garcia-Garcia I, Gonzalez-Delgado CA, Valenzuela-Silva C, Hernandez-Bernal F, Ferrero-Bibilonia J, Soto-Hernandez R, Cervantes-Llano M, Ducongé J, Correa-Fernandez A, Olivera-Ruano L, Lopez-Saura P. (2004)⁽³⁶⁾

Um estudo randomizado, cruzado, duplo-cego com um período de *wash-out* de três semanas avaliou a equivalência das propriedades farmacocinéticas, farmacodinâmicas e a segurança de uma formulação de IFN-2b (Heberon Alfa R[®]) em comparação com uma formulação referência (Viraferon[®] Alfa 2b). Foram acompanhados 14 voluntários sadios do sexo masculino. Os níveis séricos de IFN foram dosados ao longo de 48 horas e os resultados não mostraram diferença entre as formulações (ASC 2572 versus 2561 ng/h/L, C_{max} 318 versus 354 ng/L, T_{max} 8,2 versus 8,5 horas, t(1/2) 5,87 versus 6,08 horas, Ke 0,122 versus 0,118 h⁽⁻¹⁾, e MRT 10,9 versus 12,0 horas para as formulações A e B, respectivamente). As diferenças não atingiram limiar maior que 20%. As duas formulações foram clinicamente equivalentes no que diz respeito atividade antiviral do IFN e as variáveis farmacodinâmicas, não apresentaram diferenças significativas. Ambos os produtos provocaram diminuição na contagem hematológica e apresentaram perfis de segurança semelhantes. As reações adversas mais frequentes foram febre, taquicardia, cefaléia e artralguas. Com estes resultados, os autores apontam para a bioequivalência destes dois produtos.

Buchwalder PA, Buclin T, Trincharid I, Munafo A, Biollaz J. (2000)⁽³⁷⁾

Diferentes vias e esquemas de dosagem foram testados em um estudo utilizando o interferon beta1a. O estudo contou com três grupos de voluntários saudáveis. Do primeiro grupo, fizeram parte 8 indivíduos que receberam doses crescentes do fármaco (22 µg/6 UI, 44 µg/12 UI e 66 µg/18 UI), com intervalo de uma semana. O segundo grupo (n=12) recebeu doses iguais, 66 µg/18 UI, por diferentes vias (intravenosa, intramuscular e subcutânea) em intervalo de uma semana. O terceiro grupo (n=8) recebeu dose de 66 µg/18 UI por via subcutânea a cada de 48 horas. O perfil de concentração sérica de interferon beta1a foi similar entre as administrações subcutânea e intramuscular. No primeiro grupo, a ASC diferiu conforme a dose (6 UI = 86 +/- 21 UI/h/ml; dose 12 UI = 223 +/- 59 UI/h/ml; dose 18 UI = 464 +/- 158 UI/h/ml), porém a diferença significativa (p=valor) não foi calculada para este parâmetro. O CL foi maior para as doses mais baixas (p=0,0004) e o MRT foi maior para a dose intermediária (p=0,013). Os resultados com as vias de administração intramuscular e subcutânea não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na ASC e C_{max} , mas o MRT e o T_{max} foram maiores para a administração subcutânea (p=0,02).

A biodisponibilidade média absoluta foi de 27% para a administração subcutânea e 30% para administração intramuscular (diferença não significativa). O perfil farmacocinético do grupo três demonstrou acúmulo ao longo do período (48 horas). A concentração máxima (C_{max}) atingida após a quarta aplicação era duas vezes (2,0 +/- 0,3) mais elevada do que o C_{max} observado após a primeira aplicação. Os dados de concentração obtidos na fase terminal (entre 12 e 168 horas após a última dose) conduziram a uma média estimada de meia-vida de 66 horas. Assim, apesar de não se tratar de

interferon alfa, os resultados desse estudo ajudam a compreender o comportamento farmacocinético do interferon quando administrado por diferentes vias de administração.

Bruno R, Sacchi P, Maiocchi L, Zocchetti C, Ciappina V, Patruno S, Filice G. (2005)⁽³⁸⁾

Este estudo avaliou a relação entre o peso corporal e a exposição da alfapeginterferona 2a e alfapeginterferona 2b utilizadas em associação com ribavirina para o tratamento de pacientes com hepatite C crônica. A alfapeginterferona 2a é administrada na dose de 180 µg independentemente do peso corporal, enquanto que a alfapeginterferona 2b depende do peso corporal e a dose usual varia de 0,5 à 1,5 µg/kg. Neste estudo, um total de 22 pacientes foram tratados com INF peguilado durante 12 semanas. Os pacientes foram distribuídos aleatoriamente numa proporção de 1:1 para receber uma vez por semana alfapeginterferona 2a 180 µg (n=10) ou alfapeginterferona 2b 1,0 µg/kg (n=12). A ribavirina foi administrada com base no peso corporal dos pacientes, 1000 mg/dia (peso <ou=75 kg) ou 1200 mg/dia (peso acima de 75 kg). A área sob a curva (ASC) para ambos os medicamentos foi calculada e os autores não encontraram correlação entre o peso corporal e ASC para a alfapeginterferona 2a ou alfapeginterferona 2b. No entanto, foi detectada uma variabilidade considerável no parâmetro ASC entre os pacientes que fizeram uso de alfapeginterferona 2a (CV 37,5%) e alfapeginterferona 2b (CV 36,8%). Assim, parece não haver razão para um regime de dosagem por peso corporal quando a indicação de tratamento for a alfapeginterferona 2a, visto que, a ASC da alfapeginterferona 2b, mesmo corrigida peso corporal, também apresentou alta variabilidade inter-indivíduo.

B. J. Brennan, P. N. Morcos, K. Wang, S. D. Blotner, R. Morrison, C. H. Hagedorn, T. C. Marbury, M. Sulkowski, J. F. Grippo (2012)⁽³⁹⁾

Estudo avaliou a farmacocinética da alfapeginterferona 2a e ribavirina em 44 pacientes com genótipo 1 de hepatite C (HCV) divididos em grupos de etnias diferentes: caucasianos (n=16), hispânicos (n=14) e afro-americanos (n=17). O objetivo do estudo foi comparar os parâmetros farmacocinéticos do grupo de hispânicos e afro-americanos com o grupo de caucasianos. Os pacientes receberam durante oito semanas uma dose de 180 µg de alfapeginterferona 2a e ribavirina (1000 ou 1200 mg/dia). Foram tomadas amostras após a primeira dose e na 8ª semana. Os parâmetros farmacocinéticos medidos foram C_{max} , T_{max} , ASC e CL/F utilizando para análise método não compartimental.

Os resultados não apresentaram diferença entre pacientes afro-americanos e hispânicos nos parâmetros farmacocinéticos após administração de dose única em comparação com pacientes caucasianos. Os parâmetros farmacocinéticos calculados para a ribavirina foram semelhantes entre os pacientes hispânicos e brancos para a administração de dose única. No entanto, o C_{max} atingido no grupo de Afro-americanos foi 33% menor ($p < 0,05$) em comparação os caucasianos. Não foram observadas diferenças nos parâmetros farmacocinéticos dos pacientes Afro-americanos ou hispânicos em comparação com pacientes caucasianos que fizeram uso de alfapeginterferona-2a. Para ribavirina, não foram observadas diferenças nos parâmetros farmacocinéticos entre pacientes latinos e caucasianos, no entanto, houve uma tendência para o aumento da depuração da ribavirina e uma

diminuição da exposição foi observada em pacientes Afro-americanos *versus* pacientes caucasianos, porém sem significância clínica.

M. Diago, J. Crespo, A. Oliveira, R. Perez, R. Barcena, J. M. Sanchez - Tapias, M. Munhoz-Sanchez, M. Romero-Gomez (2007)⁽⁴⁰⁾

Setenta e cinco pacientes com Hepatite C crônica foram randomizados para receber alfapeginterferona 2a na dose de 180, 270 e 360 µg durante 12 semanas, mais ribavirina. A área sob a curva de concentração por tempo de alfapeginterferona 2a aumentou a partir da semana 0 até a semana 12 dependente da dose ($p < 0,0001$). A taxa de resposta virológica sustentada (RVS) foi maior para o grupo que recebeu maior dose (38%, 30% e 18%, nas doses 360, 270 e 180 respectivamente). Dessa forma, conclui-se que doses crescentes de alfapeginterferona 2a resultaram no aumento da exposição do vírus ao fármaco.

3 MARCO TEÓRICO

A peguilação da alfainterferona representou vantagem ao permitir solucionar os problemas das formulações convencionais já mencionados^(41, 42). Uma absorção mais lenta tende a reduzir o C_{max} e com isso, poderia haver redução da intensidade dos eventos adversos. Com uma velocidade de eliminação mais lenta, garantimos a conservação de concentrações inibitórias da replicação viral ao longo do tempo, até o ponto de poder retardar a administração a uma aplicação semanal, com igual ou maior eficácia que o IFN convencional.

Em essência, ambos os IFNs peguilados demonstraram cumprir com as expectativas pelas quais foram desenhados: retardar a absorção, reduzir o volume de distribuição e reduzir a depuração do produto. A soma destes três fatores em conjunto a um incremento significativo no tempo de permanência da molécula no organismo justifica a possibilidade de administração semanal do produto⁽⁴³⁾.

O processo para alcançar uma conjugação efetiva e estável entre a alfainterferona 2a e 2b ao polietilenoglicol é complexo. A ligação da alfainterferona 2b à uma molécula PEG ramificada contendo quatro cadeias de 12 kDa resultou em uma estrutura química que deu origem ao produto, denominado neste trabalho, como Formulação B (alfapeginterferona 2b 48 kDa). Um dos aspectos mais importantes neste processo de obtenção da alfapeginterferona é a geração de vários isômeros de posição, o que, por definição, possuem diferentes atividades biológicas, pois a ligação do PEG a locais diferentes da proteína provoca interferência distinta entre o receptor das

células e IFN. Este fenômeno também pode afetar o comportamento farmacocinético da alfapeginterferona. Adicionalmente, deve ser considerado que entre o produto comercial referência (Formulação A - IFN alfa-2a) e a Formulação B (IFN alfa-2b), a única diferença com relação a estrutura proteica consiste na mudança de um aminoácido. Este fator não afeta a cinética do produto não peguilado, mas não se descarta que pode afetar a união ao PEG, provocando algum tipo de mudança estrutural.

No contexto nacional, entre as instituições públicas de pesquisa, a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) é um dos principais atores do setor da biotecnologia. A FIOCRUZ, vinculada ao Ministério da Saúde, é uma das mais proeminentes instituições de Ciência e Tecnologia (C&T) na área da saúde da América Latina. A promoção da saúde e o desenvolvimento social são valores fundamentais institucionais. O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) é uma das unidades técnicas de produção da FIOCRUZ e é um dos maiores fornecedores de produtos imunobiológicos, tais como vacinas, biofármacos e reativos para diagnóstico, contando também com Programas direcionados ao desenvolvimento tecnológico.

Visando estabelecer a nível nacional uma plataforma de engenharia e ativação de polímeros sintéticos para posterior conjugação a proteínas, de forma a atribuir o aumento da meia-vida de determinados produtos biofarmacêuticos, no início do ano de 2008, Bio-Manguinhos e o Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia de Cuba (CIGB/Heber Biotec) oficializaram a parceria para o desenvolvimento conjunto com transferência de tecnologia. Esta colaboração possibilitou o desenvolvimento de uma nova estrutura polimérica que está sendo utilizada na peguilação do já licenciado

interferon alfa 2b produzido por Bio-Manguinhos que tem o perfil de eficácia, qualidade e segurança bem estabelecida.

4 JUSTIFICATIVA

Considerando a incidência e a prevalência da infecção do vírus da hepatite C no Brasil, a eficácia terapêutica das alfapeginterferonas e os elevados custos destes medicamentos no mercado internacional, é mister se estudar alternativas que ofereçam uma relação custo-benefício mais favorável, para ser utilizado no sistema de saúde brasileiro, além de desenvolver as tecnologias necessárias para que o Sistema Único de Saúde diminua sua dependência de medicamentos importados para o tratamento destas doenças.

Após o desenvolvimento de uma formulação de alfainterferona 2b, conjugada à uma molécula de PEG ramificada contendo quatro cadeias de 12 kDa, com resultados satisfatórios nos ensaios pré-clínicos, decidiu-se realizar estudo clínico de fase I para avaliar seu comportamento farmacocinético em comparação com a alfapeginterferona 2a, disponível comercialmente.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Comparar a farmacocinética de duas formulações de alfainterferona (2a e 2b) conjugada ao polietilenoglicol de tamanhos moleculares diferentes (40 kDa e 48 kDa, respectivamente) em voluntários sadios, assumindo critérios rigorosos de regulamentação para posterior registro do novo produto.

5.2 Objetivos específicos

Comparar a farmacocinética dos dois produtos utilizando os seguintes parâmetros:

- concentração máxima (C_{max})
- área sob a curva (ASC)
- tempo máximo (T_{max})
- medida de absorção (CAV)
- tempo de meia-vida ($t_{1/2}$)
- depuração (CL)
- volume de distribuição (Vd)
- tempo médio de residência (MRT)
- constante de eliminação (K_e)
- tempo de absorção médio (MAT)
- valor de tempo de duração da concentração média (HVD)

Neste documento apresentaremos os resultados do estudo de farmacocinética conforme recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária para estudos de Bioequivalência, embora o objetivo não seja demonstrar bioequivalência entre as Formulações e sim comparar as médias dos parâmetros farmacocinéticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pagkalis S, Mantadakis E, Mavros MN, Ammari C, Falagas ME. Pharmacological considerations for the proper clinical use of aminoglycosides. *Drugs*. 2011 Dec;71(17):2277-94. PubMed PMID: 22085385. eng.
2. Leon Shargel, Susanna Wu-Pong, Yu ABC. *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*. Edition t, editor2004.
3. Harris JM, Chess RB. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov*. 2003 Mar;2(3):214-21. PubMed PMID: 12612647. eng.
4. Suzuki T, Kanbara N, Tomono T, Hayashi N, Shinohara I. Physicochemical and biological properties of poly(ethylene glycol)-coupled immunoglobulin G. *Biochim Biophys Acta*. 1984 Jul;788(2):248-55. PubMed PMID: 6743669. eng.
5. Baillargeon MW, Sonnet PE. Lipase modified for solubility in organic solvents. *Ann N Y Acad Sci*. 1988;542:244-9. PubMed PMID: 3228234. eng.
6. Hadley KB, Sato PH. Catalytic activity of administered gulonolactone oxidase polyethylene glycol conjugates. *Enzyme*. 1989;42(4):225-34. PubMed PMID: 2517112. eng.
7. Cao SG, Zhao QY, Ding ZT, Ma L, Yu T, Wang JH, et al. Chemical modification of enzyme molecules to improve their characteristics. *Ann N Y Acad Sci*. 1990;613:460-7. PubMed PMID: 2075996. eng.
8. Chen RH, Abuchowski A, Van Es T, Palczuk NC, Davis FF. Properties of two urate oxidases modified by the covalent attachment of poly(ethylene glycol). *Biochim Biophys Acta*. 1981 Aug;660(2):293-8. PubMed PMID: 7197160. eng.

9. Katre NV, Knauf MJ, Laird WJ. Chemical modification of recombinant interleukin 2 by polyethylene glycol increases its potency in the murine Meth A sarcoma model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Mar;84(6):1487-91. PubMed PMID: 3494243. Pubmed Central PMCID: PMC304459. eng.
10. Ho DH, Brown NS, Yen A, Holmes R, Keating M, Abuchowski A, et al. Clinical pharmacology of polyethylene glycol-L-asparaginase. *Drug Metab Dispos*. 1986 May-Jun;14(3):349-52. PubMed PMID: 2872037. eng.
11. Knauf MJ, Bell DP, Hirtzer P, Luo ZP, Young JD, Katre NV. Relationship of effective molecular size to systemic clearance in rats of recombinant interleukin-2 chemically modified with water-soluble polymers. *J Biol Chem*. 1988 Oct;263(29):15064-70. PubMed PMID: 3049599. eng.
12. Mast AE, Salvesen G, Brucato FH, Schnebli HP, Pizzo SV. Polyethylene glycol modification of serpins improves therapeutic potential. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1990 May;371 Suppl:101-9. PubMed PMID: 2400571. eng.
13. Satake-Ishikawa R, Ishikawa M, Okada Y, Kakitani M, Kawagishi M, Matsuki S, et al. Chemical modification of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor by polyethylene glycol increases its biological activity in vivo. *Cell Struct Funct*. 1992 Jun;17(3):157-60. PubMed PMID: 1379521. eng.
14. Davis S, Abuchowski A, Park YK, Davis FF. Alteration of the circulating life and antigenic properties of bovine adenosine deaminase in mice by attachment of polyethylene glycol. *Clin Exp Immunol*. 1981 Dec;46(3):649-52. PubMed PMID: 7337981. Pubmed Central PMCID: PMC1536305. eng.

15. Abuchowski A, Kazo GM, Verhoest CR, Van Es T, Kafkewitz D, Nucci ML, et al. Cancer therapy with chemically modified enzymes. I. Antitumor properties of polyethylene glycol-asparaginase conjugates. *Cancer Biochem Biophys*. 1984 Jun;7(2):175-86. PubMed PMID: 6467175. eng.
16. Tsuji J, Hirose K, Kasahara E, Naitoh M, Yamamoto I. Studies on antigenicity of the polyethylene glycol (PEG)-modified uricase. *Int J Immunopharmacol*. 1985;7(5):725-30. PubMed PMID: 2412977. eng.
17. Nucci ML, Olejarczyk J, Abuchowski A. Immunogenicity of polyethylene glycol-modified superoxide dismutase and catalase. *J Free Radic Biol Med*. 1986;2(5-6):321-5. PubMed PMID: 2439563. eng.
18. Yokoyama M, Miyauchi M, Yamada N, Okano T, Sakurai Y, Kataoka K, et al. Characterization and anticancer activity of the micelle-forming polymeric anticancer drug adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer. *Cancer Res*. 1990 Mar;50(6):1693-700. PubMed PMID: 2306723. eng.
19. Yamaoka T, Tabata Y, Ikada Y. Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice. *J Pharm Sci*. 1994 Apr;83(4):601-6. PubMed PMID: 8046623. eng.
20. Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *J Viral Hepat*. 1999 Jan;6(1):35-47. PubMed PMID: 10847128.

21. Ministério da Saúde B. Protocolo Clínico e Diretrizes para o tratamento da Hepatite Viral C. 2011.
22. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*. 2001 Sep 22;358(9286):958-65. PubMed PMID: 11583749.
23. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL, Jr., et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2002 Sep 26;347(13):975-82. PubMed PMID: 12324553.
24. Ferenci P. Peginterferon alfa-2a (40KD) (Pegasys) for the treatment of patients with chronic hepatitis C. *Int J Clin Pract*. 2003 Sep;57(7):610-5. PubMed PMID: 14529063. eng.
25. Robins GW, Scott LJ, Keating GM. Peginterferon-alpha-2a (40kD): a review of its use in the management of patients with chronic hepatitis B. *Drugs*. 2005;65(6):809-25. PubMed PMID: 15819595. eng.
26. Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:307-36. PubMed PMID: 15771573. eng.
27. Lam NP, Neumann AU, Gretch DR, Wiley TE, Perelson AS, Layden TJ. Dose-dependent acute clearance of hepatitis C genotype 1 virus with interferon alfa. *Hepatology*. 1997 Jul;26(1):226-31. PubMed PMID: 9214474. eng.
28. Peginterferon alfa-2b product monograph.

29. Ramon J, Saez V, Baez R, Aldana R, Hardy E. PEGylated interferon-alpha2b: a branched 40K polyethylene glycol derivative. *Pharm Res.* 2005 Aug;22(8):1374-86. PubMed PMID: 16078148. eng.
30. A branched methoxy 40 kDa polyethylene glycol (PEG) moiety optimizes the pharmacokinetics (PK) of peginterferon alpha-2a (PEG-IFN) and may explain its enhanced efficacy in chronic hepatitis C (abst 120). <st1:city w:st="on"><st1:place w:st="on">Dallas: American association for the study of liver diseases (AASLD), 1999.
31. Gupta SK, Pittenger AL, Swan SK, Marbury TC, Tobillo E, Batra V, et al. Single-dose pharmacokinetics and safety of pegylated interferon-alpha2b in patients with chronic renal dysfunction. *J Clin Pharmacol.* 2002 Oct;42(10):1109-15. PubMed PMID: 12362925. eng.
32. Gupta SK, Swan SK, Marbury T, Smith W, Schwartz S, Kolz K, et al. Multiple-dose pharmacokinetics of peginterferon alfa-2b in patients with renal insufficiency. *Br J Clin Pharmacol.* 2007 Dec;64(6):726-32. PubMed PMID: 17555463. Pubmed Central PMCID: PMC2198783. eng.
33. Bruno R, Sacchi P, Cima S, Maiocchi L, Novati S, Filice G, et al. Comparison of peginterferon pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles. *J Viral Hepat.* 2012 Jan;19 Suppl 1:33-6. PubMed PMID: 22233411. eng.
34. Bruno R, Sacchi P, Scagnolari C, Torriani F, Maiocchi L, Patruno S, et al. Pharmacodynamics of peginterferon alpha-2a and peginterferon alpha-2b in interferon-naïve patients with chronic hepatitis C: a randomized, controlled study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007 Aug;26(3):369-76. PubMed PMID: 17635371. eng.

35. García-García I, González-Delgado CA, Valenzuela-Silva CM, Díaz-Machado A, Cruz-Díaz M, Nodarse-Cuní H, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic comparison of two "pegylated" interferon alpha-2 formulations in healthy male volunteers: a randomized, crossover, double-blind study. *BMC Pharmacol.* 2010;10:15. PubMed PMID: 21092287. Pubmed Central PMCID: PMC3001701. eng.
36. Garcia-Garcia I, Gonzalez-Delgado CA, Valenzuela-Silva C, Hernandez-Bernal F, Ferrero-Bibilonia J, Soto-Hernandez R, et al. Bioequivalence of two recombinant interferon alpha-2b liquid formulations in healthy male volunteers. *Drugs R D.* 2004;5(5):271-80. PubMed PMID: 15357626. eng.
37. Buchwalder PA, Buclin T, Trinchard I, Munafo A, Biollaz J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of IFN-beta 1a in healthy volunteers. *J Interferon Cytokine Res.* 2000 Oct;20(10):857-66. PubMed PMID: 11054273. eng.
38. Bruno R, Sacchi P, Maiocchi L, Zocchetti C, Ciappina V, Patruno S, et al. Area-under-the-curve for peginterferon alpha-2a and peginterferon alpha-2b is not related to body weight in treatment-naive patients with chronic hepatitis C. *Antivir Ther.* 2005;10(2):201-5. PubMed PMID: 15865213. eng.
39. Brennan BJ, Morcos PN, Wang K, Blotner SD, Morrison R, Hagedorn CH, et al. The pharmacokinetics of peginterferon alfa-2a and ribavirin in African American, Hispanic and Caucasian patients with chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012 May;35(10):1209-20. PubMed PMID: 22469033. eng.
40. Diago M, Crespo J, Oliveira A, Pérez R, Bárcena R, Sánchez-Tapias JM, et al. Clinical trial: pharmacodynamics and pharmacokinetics of re-treatment

with fixed-dose induction of peginterferon alpha-2a in hepatitis C virus genotype 1 true non-responder patients. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007 Oct;26(8):1131-8. PubMed PMID: 17894655. eng.

41. Monkars SP, Ma Y, Aglione A, Bailon P, Ciolek D, DeBarbieri B, et al. Positional isomers of monopegylated interferon alpha-2a: isolation, characterization, and biological activity. *Anal Biochem.* 1997 May;247(2):434-40. PubMed PMID: 9177709. eng.

42. P G, R R-P, C R. PEG-interferon-a-2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics and preliminary efficacy data. *Hepatology.* 1999;29(3):189-91.

43. Youngster S, Wang YS, Grace M, Bausch J, Bordens R, Wyss DF. Structure, biology, and therapeutic implications of pegylated interferon alpha-2b. *Curr Pharm Des.* 2002;8(24):2139-57. PubMed PMID: 12369859. eng.

6 ARTIGO

“Comparação farmacocinética de duas formulações de alfapeginterferona em voluntários sadios”

Marisa Boff Costa^{1*}Paulo Dornelles Picon^{2*§},

¹ Centro de Pesquisa Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA),
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil

² Professor Adjunto do Departamento de Medicina Interna, Universidade
Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

§Correspondência autores

Endereço de email:

MBC: marisab.costa@hotmail.com

PDP: paulopicon@gmail.com

RESUMO

Introdução

O processo de peguilação consiste de um método de modificação da estrutura proteica com o propósito de minimizar muitas das limitações que estão associadas às proteínas terapêuticas. A peguilação da alfainterferona representou vantagem ao permitir solucionar problemas desta formulação com igual ou maior eficácia que os interferons (INF) não peguilados. Uma absorção mais lenta tende a reduzir o C_{max} e com isso pode haver redução da intensidade dos eventos adversos. Com uma velocidade de eliminação mais lenta, garantimos a conservação de concentrações inibitórias da replicação viral ao longo do tempo. O incremento significativo no tempo de permanência da molécula no organismo justifica a possibilidade de administração semanal do produto.

Objetivo

Comparar o comportamento farmacocinético de duas formulações de alfapeginterferona, denominadas como Formulação A (alfapeginterferona 2a de 40 kDa) e Formulação B (alfapeginterferona 2b de 48 kDa).

Métodos

Realizou-se um estudo de fase I, aleatório, cruzado, duplo cego e unicêntrico incluindo 31 voluntários do sexo masculino, sadios, com idade entre 19 e 35 anos. Estes sujeitos de pesquisa foram estudados em duas etapas com duração de 14 dias consecutivos cada uma e com cinco semanas de “wash-out” entre cada administração subcutânea (180 µg de um dos produtos). A variável principal foi a avaliação da concentração sérica de

alfaPEGinterferona, determinada por ensaio imunoenzimático em 15 coletas durante o tempo do estudo.

Resultados

Não foram observadas diferenças entre as duas formulações para as medidas de magnitude (C_{max} ($p=0,318$), $ASC_{(0-336)}$ ($p=0,464$)) nem de absorção ($CAV_{(0-336)}$ ($p=0,384$), MAT ($p=0,299$)). Os parâmetros farmacocinéticos de tempo apresentaram resultados significativamente maiores para a Formulação B em comparação a Formulação A (T_{max} : 73 vs 54 horas ($p=0,0010$); $MRT_{(0-336)}$: 133 vs 115 horas ($p=0,0324$); K_e : 0.008 vs 0.009 horas⁽⁻¹⁾ ($p=0,0153$); $t_{1/2}$: 192 vs 118 horas ($p=0,0218$), respectivamente).

Conclusão

Conclui-se que a Formulação B apresentou os perfis farmacocinéticos de magnitude semelhantes aos da Formulação A e diferentes quanto aos parâmetros de tempo. Mais estudos são necessários para entendermos as repercussões clínicas destes achados.

Palavras-Chave

Farmacocinética, alfaPEGinterferona, Fase I

INTRODUÇÃO

Estudar o perfil farmacocinético de um medicamento é uma etapa importante para compreender o comportamento e a ação de fármacos no organismo. Várias características influenciam no comportamento cinético do medicamento. Praticamente todos os grupos de fármacos disponíveis foram objeto de tentativas para modificar algumas de suas características, tendo como objetivo, produzir um produto estável que, após administração, proporcione a resposta terapêutica desejada no paciente. O foco principal em todas essas alterações cabe em melhorar a farmacocinética do medicamento.

O comportamento farmacocinético de uma molécula de fármaco de natureza proteica unida a uma estrutura química que pertence à família do polietilenglicol (PEG) é discutido neste estudo. O processo de peguilação consiste de um método de modificação da estrutura proteica com o propósito de minimizar muitas das limitações que estão associadas às proteínas terapêuticas (ex. meia-vida curta, imunogenicidade, baixa estabilidade)⁽¹⁾. Como resultado se consegue um incremento no tempo de permanência do medicamento no organismo. Este processo de união de uma proteína com um dos PEG recebe o nome de peguilação e o novo produto originado se denomina derivado peguilado.

As moléculas peguiladas carecem de atividade farmacológica e se mostram muito aptas para modificações importantes em várias partes de sua estrutura⁽¹⁾. Além disso, oferecem a possibilidade de união linear ou ramificada de várias moléculas a diferentes lugares da estrutura de uma mesma proteína, aspectos que permitem melhorar notavelmente as possibilidades de utilização terapêutica. Sabe-se, porém, que dependendo do tamanho e a natureza da porção do polietilenoglicol (PEG), as variações dos parâmetros farmacocinéticos podem alterar

significativamente. Geralmente quanto maior é o tamanho do PEG utilizado para se fixar a um fármaco, mais lenta é a velocidade de eliminação do fármaco do organismo. Este fato faz supor a manutenção de concentrações plasmáticas do fármaco peguilado durante mais tempo, ou seja, possibilidade de administrar o fármaco em intervalos mais prolongados. Por outro lado, quanto maior é o número de ligações de uma molécula com PEG, maior será a possibilidade de que existam interferências na atividade farmacológica. Conseguir o equilíbrio adequado é, portanto, primordial para atingir benefícios terapêuticos.

Experiência acumulada com os diferentes derivados peguilados estudados demonstraram que todos eles, em comparação ao fármaco não peguilado, apresentam maior estabilidade física e térmica⁽²⁻⁴⁾ menor susceptibilidade à degradação enzimática⁽⁵⁾, aumento da solubilidade^(6,7), redução da depuração plasmática com o correspondente aumento da meia-vida de eliminação⁽⁸⁻¹¹⁾, redução da imunogenicidade⁽¹²⁻¹⁵⁾ e da antigenicidade e por último, melhora do perfil de toxicidade⁽¹⁶⁾. Esses efeitos são devidos a modificações em relação ao fármaco original, conferindo diferentes propriedades físico-químicas que incluem mudanças de conformação, interferências estéricas, mudanças nas propriedades de fixação eletrostática, incremento da lipofilia, etc. Estas mudanças implicam em profundas alterações do comportamento do derivado peguilado, que se concentram no comportamento farmacocinético.

Um fármaco peguilado possibilita a redução no número de aplicações, este fato torna-se muito atrativo para fármacos que apresentam uma meia-vida de eliminação reduzida e que, portanto, necessitam de administrações em intervalos curtos. Outra vantagem da peguilação fica evidente ao reduzir a possível toxicidade associada a picos elevados de níveis plasmáticos.

Aprovado em novembro de 2000 pela *Food and Drug Administration (FDA)* para que fosse utilizada no tratamento de pacientes com hepatite C crônica, a monoterapia com IFN peguilado obteve 40% de resposta virológica sustentada. Nesse mesmo ano foi aprovada sua combinação com ribavirina, elevando a mesma até 61%⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. O IFN peguilado também está indicado para o tratamento da hepatite B crônica⁽²⁰⁾.

A administração pela via intramuscular ou subcutânea da forma convencional implica uma absorção muito rápida, atingindo pico de níveis séricos entre 7 a 12 horas, uma ampla distribuição e uma elevada depuração plasmática, que condiciona uma meia-vida de eliminação muito curta, de 4 a 16 horas, de forma que em 24 horas após a administração encontra-se pouco ou nenhum IFN circulante. Este perfil farmacocinético justifica a existência de oscilações rápidas e importantes das concentrações de alfainterferona, que foram associadas com os sintomas pseudo-gripais típicos da administração deste fármaco e, além disso, com um tempo de eficácia reduzido, o que permitiria pelo menos enquanto o intervalo de administração não estivesse ajustado, a replicação do vírus nos períodos em que as concentrações do produto fossem reduzidas⁽²¹⁾.

A peguilação da alfainterferona permite resolver os grandes problemas das formulações de INF não peguilado. Modificando a farmacocinética através de uma absorção mais lenta, redução do volume de distribuição e a redução da depuração do produto, é possível aumentar significativamente o tempo de residência da molécula no organismo, algo que justifica a administração semanal do INF.

Atualmente, são comercializadas duas versões de alfapeginterferona. A alfapeginterferona 2b caracteriza-se por uma ligação ao PEG com massa molecular de 12 kDa e uma estrutura linear simples, onde as ligações de união entre ambas as

moléculas é do tipo éster, situado sobre um resíduo de histidina. Sua eliminação é por via renal⁽²²⁾. A alfapeginterferona 2a é maior espacialmente e se distingue por duas cadeias ramificada de PEG, cada uma de 20 kDa de massa molecular. A ligação covalente, envolvendo um resíduo lisina na união ao PEG, faz com que seja mais resistente e capaz de ser apresentado em forma líquida. É apresentado em dose de 180 µg e a notável redução no volume de distribuição que atinge logo após a administração permite empregar essa dose de maneira uniforme, sem precisar ajuste ao peso corporal.

O desenvolvimento de uma nova molécula de alfainterferona-2b humano recombinante conjugado à um PEG ramificado de 48 kDa demonstrou uma adequada estabilidade térmica e menos susceptibilidade à degradação por proteases quando comparado com a proteína sem modificação⁽²³⁾. Os estudos pré-clínicos, realizados com a Formulação B, demonstraram um tempo de meia-vida no sangue significativamente maior do que IFN não peguilado em estudos farmacocinéticos em animais. É assumido que todas as alfapeginterferonas conhecidas sejam diferentes uma das outras nesse aspecto. De qualquer forma, a ligação da alfainterferona-2b a uma molécula PEG ramificada contendo quatro cadeias de 12 kDa resultou em uma estrutura química diferente desde sua origem.

Um dos aspectos mais importantes é a geração, durante obtenção da alfapeginterferona, de vários isômeros de posição, o que, por definição, possui diferente atividade biológica, pois a ligação do PEG a locais diferentes da proteína provoca interferência distinta entre o receptor das células e IFN. Este fenômeno também pode afetar o comportamento farmacocinético da alfapeginterferona. Adicionalmente, deve ser considerado que entre o produto comercial referência (Formulação A - INF alfa-2a) e a Formulação B (INF alfa-2b), a única diferença com

relação a estrutura proteica consiste na mudança de um aminoácido. Este fator não afeta a cinética do produto não peguado, mas não se descarta que pode afetar a união ao PEG, provocando algum tipo de mudança estrutural.

Considerando a incidência e a prevalência da infecção do vírus da hepatite C no Brasil, a eficácia terapêutica das interferonas peguadas e os elevados custos destes medicamentos, é mister se estudar alternativas que ofereçam uma relação custo-benefício mais favorável, para ser utilizado no sistema de saúde brasileiro, além de desenvolver as tecnologias necessárias para que o Sistema Único de Saúde diminua sua dependência de medicamentos importados. Sendo assim, após o desenvolvimento de uma formulação de alfainterferona 2b, conjugada à uma molécula de PEG ramificada contendo quatro cadeias de 12 kDa, com resultados satisfatórios nos ensaios pré-clínicos, decidiu-se realizar estudo clínico de fase I para avaliar seu comportamento farmacocinético, farmacodinâmico e de segurança biológica, em comparação com o similar alfapeginterferona 2a, disponível comercialmente.

O objetivo principal deste estudo é comparar a farmacocinética de duas formulações de alfainterferona (2a e 2b) conjugada ao polietilenoglicol de tamanhos moleculares diferentes (40 kDa e 48 kDa respectivamente) em voluntários sadios, assumindo critérios rigorosos de regulamentação, por meio dos seguintes parâmetros: concentração máxima (C_{max}); área sob a curva (ASC); tempo máximo (T_{max}); medida de absorção (CAV); tempo de meia-vida ($t_{1/2}$); depuração (CL); volume de distribuição (VD); tempo médio de residência (MRT); constante de eliminação terminal (K_e); tempo de absorção médio (MAT); valor de tempo de duração da concentração média (HVD).

MÉTODOS

Desenho do estudo

Trata-se de um estudo clínico de Fase I, randomizado, duplo-cego e cruzado, desenhado para 32 voluntários sadios com objetivo de avaliar os parâmetros farmacocinéticos, farmacodinâmicos e a segurança da alfapeginterferona 2a de 40 kDa e da alfapeginterferona 2b de 48 kDa.

A randomização do estudo foi planejada para gerar dois grupos de 16 voluntários a receber os produtos em duas etapas separadas por cinco semanas de *wash-out*, tempo determinado a partir dos dados de um estudo similar utilizando como referência a alfapeginterferona 2a de 40 kDa, onde o tempo de meia vida encontrado foi de aproximadamente 72 horas⁽²⁴⁾. A execução deste estudo foi dividida em quatro grupos não simultâneos. Os sujeitos foram mantidos hospitalizados, sob controle médico, durante as primeiras 96 horas de duração do estudo em cada etapa. Posteriormente compareceram periodicamente à instituição para as tomadas de amostras de sangue até concluir às 336 horas (14 dias). Durante o tempo do estudo foram tomadas 15 amostras de sangue por indivíduo em cada etapa.

Justificou-se a comparação da Formulação B (produzida no Brasil) com a Formulação A (disponível comercialmente) por apresentarem massas moleculares e resultados da farmacocinética semelhantes, o que justifica o uso da mesma dose e posologia. Além disto, estudos apontam que não há diferenças significativas de efetividade entre alfainterferona 2a e alfainterferona 2b⁽²⁴⁻²⁶⁾.

Seleção dos sujeitos

O estudo incluiu indivíduos masculinos, sadios, que atenderam espontaneamente ao convite de captação emitido pelo Centro de Pesquisa Clínica. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Critérios de diagnóstico: foram considerados sadios os indivíduos que reuniam as seguintes características: ausência de antecedentes de doenças crônicas; saúde bucal preservada à avaliação pelo odontólogo; sem evidência de distúrbios psicológicos à avaliação pelo psiquiatra; ausência de antecedentes de doenças agudas nos últimos 30 dias; ausência de sintomas e sinais clínicos significativos no exame físico; todos os exames de laboratório dentro dos limites da normalidade; todos os exames de imagem dentro dos limites da normalidade; soronegativos para os exames de determinação de HIV e vírus de Hepatites B e C.

Critérios de inclusão: foram considerados elegíveis os voluntários que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido; Cumpriram com os critérios dos diagnósticos anteriores; Sexo masculino; Idade entre 18 e 35 anos; Apresentavam índice de massa corporal entre 20 e 25,9; Indivíduos sem história de hipersensibilidade à alfainterferona, a produtos derivados de Escherichia coli, ao PEG ou a qualquer um dos sais presentes nesta preparação; Indivíduos que não foram tratados com algum tipo de interferona em qualquer momento prévio ao ensaio; Indivíduos sem antecedentes patológicos pessoais de doenças crônicas tais como: doenças autoimunes; insuficiência hepática, cirrose descompensada; cardiopatia, insuficiência renal, diabetes mellitus, tireoidopatias, hemoglobinopatias, citopenias, antecedentes de doença psiquiátrica, retinopatias, neurite óptica; doença infecciosa aguda nos últimos 30 dias; uso de medicamentos que alterassem a

imunidade; alergia conhecida ao fármaco; intervenção cirúrgica durante os 6 meses prévios ao início do estudo; doação de sangue; alcoolismo ou uso de outras drogas ilícitas; participação em estudo clínico anterior com intervenção terapêutica no ano prévio à inclusão. Como critério de não inclusão foi considerado o surgimento de qualquer um dos itens mencionados anteriormente.

Os critérios de descontinuação do estudo foram: saída do estudo por vontade do indivíduo; Eventos adversos graves ou que represente risco ao voluntário na primeira etapa do estudo.

Tratamento

Intervenções foram realizadas segundo o desenho do estudo (estudo cruzado): 16 sujeitos de pesquisa receberam 180 µg da Formulação A na etapa I e foram avaliados por 14 dias consecutivos, contando com um período de repouso de 5 semanas entre as etapas. Em seguida, na etapa II, os mesmos sujeitos de pesquisa receberam 180 µg Formulação B e foram acompanhados por 14 dias consecutivos. O mesmo esquema foi seguido para os demais 16 sujeitos de pesquisa randomizados para receber 180 µg da Formulação B. A dose de alfapeginterferona foi administrada por via subcutânea na região deltóidea com os sujeitos em jejum de 12 horas. Para o tratamento dos sintomas pseudo-gripais, foi previsto a administração de paracetamol 750 mg como tratamento concomitante. A critério médico, administrou-se comprimidos de ibuprofeno 400 mg ou dipirona 500 mg para alívio dos eventos adversos.

Método de alocação

A randomização foi realizada com o software "R", em um bloco, e cuja lista de alocação não foi revelada à equipe do trabalho de campo. Os voluntários foram

randomizados em dois grupos de 16. No momento da inclusão, o número do participante foi designado de forma consecutiva, a partir do primeiro indivíduo.

Cegamento do estudo

Como as apresentações dos dois produtos são diferentes, apenas o profissional que administrou as injeções, enfermeira (não cega), teve conhecimento do produto administrado a cada voluntário. O produto foi administrado por via subcutânea na região deltóidea direita por meio de um biombo, de forma que o paciente não enxergasse o produto administrado e nem a enfermeira pudesse identificar o voluntário. Os voluntários receberam a aplicação do produto investigacional imediatamente após a randomização na etapa um. Na etapa dois, a numeração foi obrigatoriamente a mesma da etapa anterior com os sujeitos recebendo o produto comparador.

Os médicos avaliadores, monitores e equipe de laboratório também analisaram as amostras do ensaio às cegas. Durante a condução do estudo, não houve necessidade da abertura do código de randomização antes da análise final dos dados.

Variáveis farmacocinéticas avaliadas

A variável principal foi a concentração da Alfapeginterferona em soro, dosada nos tempos Antes e 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 120, 168, 216, 264 e 336 horas depois da administração do alfainterferona peguilado. As coletas puderam ser realizadas num intervalo de tempo de cinco minutos antes ou depois do horário previsto, sem que isso gerasse quebra de protocolo.

Quantificação de alfapeginterferona no soro

A quantificação sérica de alfainterferona permite comparar a farmacocinética dos dois produtos em estudo através da determinação de parâmetros que descrevem a similaridade entre elas. Para a determinação de alfainterferona foi utilizado o teste de Elisa. Neste estudo utilizou-se um EIE comercializado pelo fabricante BPL para alfainterferona humano não peguilado, por não existir kits comerciais disponíveis para quantificação de IFN peguilado.

Fator de Correção para a determinação de alfapeinterferona no soro

Para validar a detecção dos INF peguilado com anticorpos destinados a reconhecer a molécula de IFN alfa convencional foi necessário estabelecer um fator de correção que correlacionasse as determinações de INF peguilado e não peguilado. A metodologia consistiu em determinar as concentrações mais adequadas de alfapeginterferona 2a e 2b, para que, ao realizar o ensaio ELISA, fosse possível determinar o maior número de concentrações aparentes com valores próximos aos valores indicados pelo Fabricante do Kit. Determinaram-se os fatores de correção para os valores de concentração a partir da absorbância obtida com o EIA, de acordo com o tipo de molécula e a diluição de soro empregada.

A avaliação ocorreu nos seguintes passos para cada produto em teste: ajuste das concentrações reais mais adequadas para comparação com as concentrações da curva-padrão, recomendadas para IFN não peguilado; Determinação do método de ajuste da curva-padrão. Determinação do método de cálculo para o fator de correção; Realização do ensaio, com todos os parâmetros determinados, e repetição do mesmo, seis vezes, por três técnicos diferentes (duas vezes cada técnico); Verificação da linearidade dos resultados obtidos por meio do ajuste de retas de regressão simples das concentrações reais pelas concentrações aparentes; Cálculo

do fator de correção final pelo método eleito como mais adequado, e pelos outros métodos propostos, com o fim de comparar os resultados obtidos.

Em todos os casos, por se tratar de um ensaio biológico, onde é reconhecido que pode haver grande variação entre os ensaios, o coeficiente de variação máximo aceitável foi de 25%. Além disso, para uma repetição ser considerada válida, foi preciso que pelo menos três pontos da curva fossem considerados aceitáveis. Realizou-se também a investigação de *outliers* (valores extremos) por meio de análises descritivas e gráficos *Box-plot* e esses valores, quando existentes, foram excluídos do cálculo final do fator de correção. Essa determinação foi realizada no Laboratório de Imunobiológico (LATIM) de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ.

Análise dos parâmetros farmacocinéticos

Os perfis farmacocinéticos das Formulações A e B foram definidos a partir do cálculo dos principais parâmetros farmacocinéticos que descrevem as etapas de absorção e eliminação do fármaco. O cálculo dos parâmetros farmacocinéticos foi realizado a partir dos valores séricos experimentais de alfapeginterferona considerando um modelo farmacocinético não compartimental. Foram calculados os seguintes parâmetros: concentração máxima (C_{max}); área sob a curva (ASC); tempo máximo (T_{max}); medida de absorção (CAV); tempo de meia-vida ($t_{1/2}$); depuração (CL); volume de distribuição (VD); tempo médio de residência (MRT); constante de eliminação terminal (K_e); tempo de absorção médio (MAT); valor de tempo de duração da concentração média (HVD)

ESTATÍSTICA

Cálculo do tamanho da amostra

Utilizou-se como referência para realizar o cálculo amostral para este estudo os resultados de um estudo de farmacocinética comparada⁽²⁴⁾ onde se administrou

uma dose única de 180 µg a 16 voluntários sadios. Considerando uma diferença de até 30%, perda de acompanhamento de até 10%, erro alfa de 0,10 e poder de 80%, levando em conta os resultados obtidos para o CAV_{inf} , parâmetro farmacocinético, que se calcula a partir da relação de dois parâmetros fundamentais - C_{max} e ASC , calculou-se como necessária a inclusão de 32 voluntários. Este número de sujeitos está dentro do número de indivíduos recomendado pela ANVISA e pelas agências reguladoras internacionais para estudos de farmacocinética comparada.

Análise estatística

Para as medidas farmacocinéticas C_{max} , $ASC_{(0-t)}$ e T_{max} , foram estimadas as medidas de tendência central e dispersão para cada grupo (média, mediana, intervalo de confiança de 95% para a média, valores mínimos e máximos, desvio padrão, classe quartílica) para as medidas farmacocinéticas originais. O limite de intervalo para diferenças entre as médias utiliza a regra +/- 20% para equivalência. Também foram avaliados os pressupostos para a realização de testes paramétricos. Foi verificado o cumprimento dos supostos de normalidade (teste de Shapiro-Wilk). Casos não se satisfazem, foram procuradas transformações logarítmicas. A análise estatística com os parâmetros que satisfazem as supostas distribuições foi realizada pelo método paramétrico para desenhos cruzados (ANOVA) e foram estimados os intervalos de confiança de 90% e/ou 95% segundo Westlake para a diferença entre os parâmetros farmacocinéticos de ambos os tratamentos.

Para as demais medidas farmacocinéticas, seguiu-se:

Estimativa das medidas de tendência central e dispersão (média, mediana, intervalo de confiança de 95% para a média, valores mínimos e máximos, desvio padrão, classe quartílica) para cada parâmetro farmacocinético calculado. Foi realizada análise pelo método de Wilcoxon com intervalo de confiança de 95%.

RESULTADOS

Conjunto de dados avaliados

Todas as análises foram realizadas por intenção de tratar. O desenho do estudo previa a inclusão de 32 voluntários saudáveis, mas atendendo aos critérios de inclusão, o número total de randomizados foi de 31 voluntários. Todos os sujeitos de pesquisa foram considerados nas análises demográficas. As análises farmacocinéticas foram realizadas com 28 voluntários, já que houve três cujos níveis séricos de PEG-IFN não foram detectados na maioria das amostras coletadas na segunda etapa (Sujeito # 20, exceto nas 36h; Sujeito # 21, exceto nas 12, 24 e 36 horas; Sujeito # 31: em todo o perfil).

Características demográficas e basais

O comportamento das variáveis demográficas dos voluntários mostrou que a população estudada foi predominantemente branca (80,6%) com média de 1,74 metros de altura e 70,8 kg de peso corporal. A idade média foi de 26,1 anos (19 a 35).

Tabela 1: Características demográficas antropológicas dos voluntários do estudo.

<i>Variáveis</i>		<i>Sequência AB (16)</i>	<i>Sequência BA (15)</i>	<i>Total (31)</i>
Idade	Média ±DP	25±5	27±5	26 ± 5
	Mediana ± SQ	25±9	27±5	26 ± 9
	Mínimo; Máximo	19; 32	19; 35	19; 35
Peso	Média ±DP	72±6	69±8	70 ± 7
	Mediana ± SQ	71±8	71±12	71 ± 10
	Mínimo; Máximo	63; 83	53; 84	53; 84
Altura	Média ±DP	174±4	174 ± 6	174 ± 5
	Mediana ± SQ	171 ± 6	173 ± 5	174 ± 5
	Mínimo; Máximo	167; 184	165; 192	164; 185
Índice de Massa corpórea	Média ±DP	23,6 ± 1.2	22,7 ± 2.0	23,2 ± 1,7
	Mediana ± SQ	23,8 ± 2.0	22,5 ± 3.7	23,6 ± 2,8
	Mínimo; Máximo	20,8; 25,1	19,7; 25,8	19,7; 25,8
Superfície	Média ±DP	1,86 ± 0,09	1,83 ± 0,13	1,85 ± 0,11

corporal	Mediana \pm SQ	1,86 \pm 0,16	1,83 \pm 0,16	1,84 \pm 0,15
	Mínimo; Máximo	1,76; 2,04	1,57; 2,07	1,57; 2,07
Cor da pele	Branca	14 (87,5%)	11 (73,3%)	25 (80,6%)
	Negra	2 (12,5%)	1 (6,7%)	3 (9,7%)
	Mestiça	0 (0%)	3 (20,0%)	(9,7%)

Resultados de Farmacocinética

A Figura 1 mostra os perfis farmacocinéticos, dos níveis séricos de alfapeginterferona para ambas as Formulações.

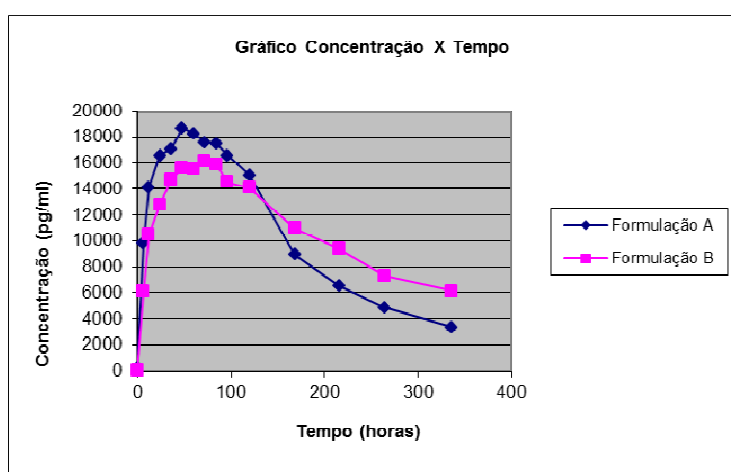


Figura 1: Curvas de concentração plasmática (pg/ml) média X tempo (horas) das Formulações A e B

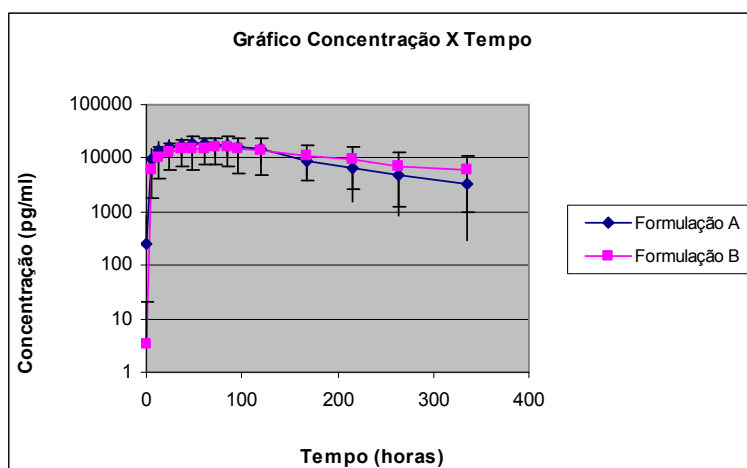


Figura 2: Curvas de concentração plasmática (pg/ml) média X tempo (horas) das Formulações A e B em escala logarítmica

Nestes gráficos observa-se que as curvas de ambas as Formulações descrevem um comportamento de acordo com a peguilação de sua estrutura. Nos dois casos são bem definidas as etapas de absorção, ponto de concentração máxima e a etapa de eliminação. Apesar disto, a primeira vista, nota-se que existem diferenças ao longo do perfil farmacocinético para o qual a Formulação A, atingiu valores séricos máximos em menor tempo e maior velocidade de eliminação do organismo.

Na Tabela 2 são apresentadas as medidas de tendência central e dispersão dos parâmetros farmacocinéticos para as Formulações A e B. A teoria do modelo estatístico foi aplicada e os resultados são apresentados na Tabela 3 apresentando também as medidas de tendência central e dispersão dos parâmetros farmacocinéticos. Esses parâmetros corroboram com as a análise farmacocinética realizada apenas pelo modelo matemático.

Tabela 2: Estatística dos parâmetros farmacocinéticos médios

Parâmetro	Formulação A		Parâmetro	Formulação B		P-valor ANOVA
T _{max} (horas)	Média	54	T _{max} (horas)	Média	73	0,001
	DP	18		DP	22	
	Mediana	48		Mediana	72	
	Mínimo	24		Mínimo	24	
	Máximo	96		Máximo	120	
	CV	33,3		CV	30,1	
C _{max} (pg/ml)	Média	19960	C _{max} (pg/ml)	Média	18630	0,3185
	DP	7066		DP	8641	
	Mediana	19019		Mediana	17489	
	Mínimo	9437		Mínimo	2527	
	Máximo	34264		Máximo	35833	
	CV	35,4		CV	46,3	
Ke (^h -1)	Média	0,009	Kel (^h -1)	Média	0,008	0,0153
	DP	0,007		DP	0,013	
	Mediana	0,006		Mediana	0,003	
	Mínimo	0,002		Mínimo	0,001	
	Máximo	0,027		Máximo	0,0714	
	CV	77,7		CV	162,5	

T ½ (horas)	Média	118	T ½ (horas)	Média	191,8	0,0218
	DP	69,3		DP	128,7	
	Mediana	113		Mediana	209,1	
	Mínimo	25,3		Mínimo	7,4	
	Máximo	311,8		Máximo	548,3	
	CV	58,7		CV	67,1	
ASC ₍₀₋₃₃₆₎ (pg/h/ml)	Média	3449752	ASC ₍₀₋₃₃₆₎ (pg/h/ml)	Média	3622281	0,4649
	DP	1562761		DP	2197201	
	Mediana	3198103		Mediana	3135326	
	Mínimo	1111243		Mínimo	186754	
	Máximo	6517569		Máximo	8108909	
	CV	45,3		CV	60,6	
ASC _(0-inf) (pg/h/ml)	Média	4412575	ASC _(0-inf) (pg/h/ml)	Média	5979501	0,0053
	DP	2373083		DP	4066639	
	Mediana	3561666		Mediana	5745175	
	Mínimo	1341214		Mínimo	192910	
	Máximo	11264812		Máximo	14972196	
	CV	58,7		CV	68,0	

Tabela 3: Análise Não Compartmental (Modelo Estatístico) das medidas farmacocinéticas das Formulações A e B

<i>Parâmetro</i>	<i>Formulação A</i>		<i>Parâmetro</i>	<i>Formulação B</i>		<i>P-valor ANOVA</i>
MRT ₍₀₋₃₃₆₎ (horas)	Média	115	MRT ₍₀₋₃₃₆₎ (horas)	Média	133	0,0324
	DP	27		DP	37	
	Mediana	125		Mediana	150	
	Mínimo	57		Mínimo	50	
	Máximo	145		Máximo	185	
	CV	23,4		CV	27,8	
CAV ₍₀₋₃₃₆₎ (horas)	Média	0,006	CAV ₍₀₋₃₃₆₎ (horas)	Média	0,007	0,3843
	DP	0,002		DP	0,004	
	Mediana	0,006		Mediana	0,005	
	Mínimo	0,004		Mínimo	0,004	
	Máximo	0,011		Máximo	0,022	
	CV	33,3		CV	57,1	
MRT _(0-inf) (horas)	Média	117	MRT _(0-inf) (horas)	Média	300	0,0003
	DP	82		DP	172	
	Mediana	176		Mediana	324	
	Mínimo	68		Mínimo	52	
	Máximo	429		Máximo	701	
	CV	70,0		CV	57,3	
CAV _(0-inf) (horas)	Média	0,005	CAV _(0-inf) (horas)	Média	0,005	0,2702
	DP	0,002		DP	0,004	

	Mediana	0,005		Mediana	0,003	
	Mínimo	0,002		Mínimo	0,002	
	Máximo	0,01		Máximo	0,022	
	CV	40		CV	80	
MAT (horas)	Média	28,1	MAT (horas)	Média	30,9	0,2992
	DP	17		DP	13,1	
	Mediana	25,5		Mediana	28,1	
	Mínimo	7,5		Mínimo	8,4	
	Máximo	70,1		Máximo	59,8	
	CV	60,49822		CV	42,39482	
HVD (horas)	Média	161	HVD (horas)	Média	216	0,3591
	DP	38		DP	101	
	Mediana	162		Mediana	254	
	Mínimo	88		Mínimo	19	
	Máximo	229		Máximo	327	
	CV	23,6		CV	46,75926	

O maior tempo de concentração máxima (73 vs 54 horas) da Formulação B, unido a seu maior tempo de residência média ($MRT_{(0-336)} = 133$ horas vs 115 horas), maior tempo de duração da concentração média (HVD = 216 horas), maior tempo de meia-vida ($t_{1/2} = 191$ horas) e menor constante de eliminação ($K_e = 0,008$) contribuíram para que o produto apresentasse no último ponto evolutivo níveis de concentração superiores à Formulação A supondo que esta diferença seja estatisticamente significativa até o infinito. A absorção de ambos os produtos foi similar segundo os resultados do coeficiente de absorção (CAV) e o tempo de absorção médio (MAT). Na análise de variância, detectou-se efeito “formulação” (diferença entre os dois produtos) somente no caso de T_{max} , $MRT_{(0-336)}$, K_e , $t_{1/2}$, $ASC_{(0-inf)}$, VD e $MRT_{(0-inf)}$.

Em ambos os períodos, num percentual elevado de sujeitos a $ASC_{(0-336)}$ não satisfaz 80% da $ASC_{(0-inf)}$. Com isso acreditamos que os resultados para a $ASC_{(0-inf)}$ e $MRT_{(0-inf)}$ devem ser desconsiderados para efeito comparativo por ter um elevado

componente de dependência do modelo ajustado na fase de eliminação. Isto se deve aos valores maiores nos parâmetros de tempo (T_{max} , $MRT_{(0-336)}$, $t_{1/2}$ e Ke) e VD , para a Formulação B.

Na Tabela 4 observam-se os resultados das análises de variância levando em consideração todas as possíveis causas de variação presentes. Variabilidade entre os sujeitos foi detectada para $ASC_{(0-336)}$, C_{max} , $MRT_{(0-336)}$, $CAV_{(0-336)}$, Ke , $ASC_{(0-inf)}$, VD , CL , $CAV_{(0-inf)}$. Efeito “período” (etapa) foi detectado nos parâmetros $MRT_{(0-336)}$, VD , $MRT_{(0-inf)}$. O Efeito residual aparece no parâmetro $MRT_{(0-336)}$ e $t_{1/2}$.

Tabela 4: Resultado da Análise ANOVA para o efeito de cada fonte de variação

	Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P
C_{max}	Etapa	50143,16	1	50143,16	0,0021	0,9639
	Sujeito	2741437530,21	27	101534723,34	4,2377	0,0002
Ke	Etapa	2,18	1	2,18	3,7808	0,0627
	Sujeito	31,11	27	1,15	1,9987	0,0407
$T_{1/2}^{***}$	Etapa	2,24	1	2,24	3,7561	0,0640
	Sujeito	28,29	26	1,09	1,8243	0,0686
$ASC_{(0-336)}$	Etapa	3691961830588,00	1	3691961830588,00	2,7897	0,1069
	Sujeito	160863281115904,00	27	5957899300589,04	4,5019	0,0001
$ASC_{(0-inf)}$	Etapa	15695831566224,00	1	15695831566224,00	3,7011	0,0658
	Sujeito	427680861353472,00	26	16449263898210,50	3,8788	0,0006
CL/F	Etapa	0,39	1	0,39	1,2360	0,2764
	Sujeito	88,93	27	3,29	10,4335	0,0000
VD/F^{***}	Etapa	1,06	1	1,06	7,7811	0,0097
	Sujeito	96,40	27	3,57	26,2770	0,0000
$MRT_{(0-inf)}$	Etapa	72323,55	1	72323,55	5,4629	0,0277
	Sujeito	533401,71	26	20515,45	1,5496	0,1386
$MRT_{(0-336)}^{***}$	Etapa	0,47	1	0,47	9,5060	0,0049*
	Sujeito	3,55	26	0,14	2,7586	0,0067*
$CAV_{(0-336)}$	Etapa	0,22	1	0,22	3,1926	0,0856
	Sujeito	5,50	27	0,20	3,0101	0,0031
$CAV_{(0-inf)}$	Etapa	0,23	1	0,23	0,7365	0,3989
	Sujeito	17,15	26	0,66	2,1201	0,0321
HVD	Etapa	0,02	1	0,02	0,0685	0,7956
	Sujeito	11,28	27	0,42	1,6799	0,0950
MAT	Etapa	0.0877030	1	0.0877030	0.2888250	0.5972132
	Sujeito	66840331,00	20	0.3342017	11.005.985	0.4188441

A detecção no efeito residual “período” para os parâmetros $MRT_{(0-336)}$, VD e $t_{1/2}$ não pode ser entendida como erro no planejamento do período de “wash out”, uma vez que este foi conduzido a partir das informações do produto de referência, para o qual o resultado se manteve dentro dos parâmetros esperados.

DISCUSSÃO GERAL

O estudo transcorreu segundo o planejamento. A administração dos produtos de alfapecinterferona foi realizada satisfatoriamente, nos tempos previstos, em todos os sujeitos. As observações clínicas e coleta de amostras foram rigorosamente cronometradas e realizadas. Os desvios de protocolo que ocorreram nos tempos de coleta das amostras foram mínimos e não tiveram impacto sobre os resultados. Não houve necessidade de violar a lista aleatória para nenhum dos indivíduos durante a execução do estudo.

Os dois grupos de sequência de tratamento foram comparáveis para todas as variáveis demográficas e basais analisadas, não existindo diferenças significativas em nenhum deles. Também houve homogeneidade entre os grupos em termos de parâmetros basais, clínicos e laboratoriais antes da administração da alfapecinterferona (tempo 0 hora) em ambos os períodos de tratamento.

A partir do resultado encontrado na literatura foi desenhado um período de cinco semanas de repouso⁽²⁴⁾ entre os tratamentos. Durante este período, é esperado que ocorra a depuração total da droga na circulação sistêmica e o desaparecimento das possíveis interferências na indução dos efeitos biológicos. No entanto, encontramos um efeito residual na Formulação B que deve ser considerado no desenho de estudos a serem realizados no futuro com este produto.

Os parâmetros selecionados (ASC , C_{max} , T_{max} , CAV , Ke , CL , VD , $t_{1/2}$, MRT , MAT , HVD) descrevem completamente todos os aspectos do comportamento farmacocinético da peginterferona. A biodisponibilidade de um produto sempre implica na velocidade e extensão da absorção. Em estudos de farmacocinética têm sido, convencionalmente, usados C_{max} e T_{max} como características da taxa de absorção^(29,30). Estes parâmetros são fáceis de interpretar e comparar com outros dados na literatura. No entanto, para análise estatística, T_{max} tem a desvantagem de ser uma variável discreta, sujeita a análise não paramétrica por depender inteiramente do delineamento experimental. A C_{max} é considerada indistintamente como um critério de magnitude e como taxa de absorção, porém, não descreve exatamente ambos os processos. Embora a interpretação biológica seja aparentemente fácil, às vezes não existem critérios para decidir quando a diferença entre dois produtos é clinicamente importante⁽³¹⁾. Neste sentido, é importante incluir outras variáveis, como MAT e CAV que podem descrever com maior precisão os fenômenos da taxa e extensão da absorção⁽³²⁾.

O período de coleta de sangue em ambas as etapas do estudo foi realizado durante as 336 horas (14 dias) para garantir que se cubra a cada etapa, pelo menos 80% da área sob a curva de concentração plasmática extrapoladas para infinito. O comportamento farmacocinético mais prolongado encontrado nas Formulações A e B impediu que se cumprisse este propósito em diversos sujeitos. Este achado está longe de ser uma limitação do estudo, mas representa o resultado lógico das primeiras avaliações de farmacocinética de um produto novo, sem consequências para o cumprimento do objetivo do estudo e que deverá ser levando em consideração para o delineamento de estudos futuros com esta mesma aplicação.

A dose selecionada (180 µg) coincide com a dose utilizada na prática clínica para o uso do medicamento de referência (Formulação A) e foi a mesma proposta para a Formulação B em virtude da semelhança observada entre massa molecular dos dois produtos. Apesar do quantitativo de proteína ser o mesmo nos dois produtos, o volume final aplicado foi diferente. A Formulação A apresenta este quantitativo em 0,5 mL, enquanto que a Formulação B apresenta em 1mL. Com esta dose foi assegurada a detecção satisfatória de títulos de IFN alfa no soro para o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos, bem como de segurança adequada e tolerabilidade perfil associado.

O perfil farmacocinético dos valores médios de concentração de alfa interferona no soro, para os produtos, demonstraram que a Formulação B atende ao comportamento esperado para sua natureza e mantêm níveis detectáveis no sangue periférico até duas semanas após a administração subcutânea⁽²³⁾. Embora tenham sido encontradas diferenças nas curvas farmacocinéticas de ambos os produtos, é importante destacar o comportamento similar em sua biodisponibilidade, e que não houve diferenças na fração de absorção (CAV) nem no tempo médio de absorção ou transporte a partir do local de administração até a circulação sistêmica (MAT).

Para estes tipos de produtos, onde se desejam obter níveis mínimos eficazes por longos períodos de tempo e reduzir o número de aplicações, os parâmetros farmacocinéticos mais importantes são aqueles que indicam permanência prolongada no organismo, e não aqueles que refletem a magnitude da droga absorvida⁽²¹⁾. A comparação dos parâmetros farmacocinéticos de ambos os produtos indicam vantagens claras da Formulação B por ficar muito mais tempo circulando no

organismo. Estes resultados são explicáveis pela diferença entre o massa molecular e estrutura das moléculas de PEG-IFN.

O T_{max} obtido foi maior para a Formulação B. Em estudos de farmacocinética prolongada a diferença entre 48 e 72 horas não têm relevância clínica. Este parâmetro tem caráter discreto dependente do tempo fixo e não de uma caracterização contínua de todo o período de amostragem avaliada. Portanto, de menor interesse a comparação com outros parâmetros que caracterizam as taxas de absorção e eliminação⁽³³⁾.

A eliminação mais lenta da Formulação B, que foi demonstrada com um K_e 2,3 vezes menor do que a Formulação A, somado ao prolongamento da MRT e HVD permitem distinguir a cinética obtida que se explica pela estrutura química e espacial dos produtos⁽³³⁾.

As diferenças farmacocinéticas entre os dois produtos foram dadas principalmente pelo efeito “formulação”. As diferenças substanciais farmacocinéticas entre uma etapa e outra ocorreram apenas em três sujeitos sem níveis séricos detectáveis no soro, após a administração da Formulação B. Esse achado pode estar relacionado com as idiosincrasias de cada sujeito, variabilidade de absorção (diferenças no local de aplicação), indução metabólica intrínseca, níveis variáveis de componentes de ligação (receptores solúveis circulantes, proteínas plasmáticas associadas ao receptor da célula), variabilidade na velocidade ou padrão de degradação. A dose (180 µg) garantiu níveis detectáveis de PEG-IFN no soro pela técnica de EIE, incluindo, às 336 horas depois da administração do produto. Podemos também dizer que esta dose permitiu uma comparação adequada da farmacocinética entre os produtos, dado os níveis induzido para cada variável particular.

Impacto dos resultados.

A demonstração das propriedades farmacocinéticas da alfainterferona na sua forma peguilada representou o cumprimento do objetivo principal e, portanto, é considerada aceitável em sua validade metodológica.

Dadas às características deste estudo clínico de fase I, onde se comparou em condições controladas, a farmacocinética dos diferentes produtos em voluntários sadios, seus resultados somente podem ser generalizados, com certeza, a populações com características similares a contemplada nos critérios de seleção do estudo, ou seja, sujeitos do sexo masculino, sadios com determinadas características físicas.

O objetivo principal de qualquer ensaio clínico é que os sujeitos de pesquisa incluídos possam obter um benefício de sua participação no estudo. Neste estudo analisou-se o grau de semelhança farmacocinética de um novo produto de alfa peginterferona produzido no Brasil, com seu similar de referência. Por se tratar de um estudo de fase I, em voluntários sadios, o impacto médico social e econômico será refletido nas futuras ações clínicas e regulatórias necessárias para concluir a aprovação do registro do produto que poderá ser útil à sociedade como um todo.

De forma imediata, os resultados deste ensaio clínico permitem definir o desenho do ensaio clínico fase II-III destinado a avaliar e ratificar os elementos de eficácia em pacientes com hepatite C crônica. Esta doença de elevada prevalência mundial, representa a principal indicação terapêutica da interferona alfa. No caso do Brasil, o registro sanitário da Formulação B permitirá atender a demanda do mercado nacional, aumentar os níveis de saúde e qualidade de vida da população e reduzir ou substituir as caras importações de produtos similares, que dado ao elevado custo, torna seu uso limitado para uma parte da população.

Os resultados farmacocinéticos do estudo só podem ser aplicados a interferona alfa-2 recombinante conjugada ao polietilenoglicol ramificado (PEG) de massa molecular 40000 e 48000 daltons.

CONCLUSÕES GERAIS

Foi atingido o objetivo do estudo de demonstrar que a Formulação B (alfapeginterferona 2b 48 kDa) tem o perfil farmacocinético semelhantes ao da Formulação A quanto aos parâmetros de concentração. Foi demonstrado que a Formulação B permanece por mais tempo no organismo, dado pela diferença estatisticamente significativa em as variáveis de tempo, tais como $t_{1/2}$, MRT, K_e e T_{max} , que indicam eliminação mais lenta.

"Comparison of pharmacokinetics of two peginterferon alfa formulations in healthy volunteers"

Marisa Boff Costa^{1*}Paulo Dornelles Picon^{2*§},

¹ Center of Clinical Research, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA),
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

² Professor of Internal Medicine, Faculdade de Medicina do Rio Grande do Sul
(UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

§Corresponding author

Email addresses:

MBC: marisab.costa@hotmail.com

PDP: paulopicon@gmail.com

ABSTRACT

Background

The pegylation process is a method to modify the protein structure in order to minimize many of the limitations associated with therapeutic proteins. The pegylation of interferon (INF) alpha represented advantage in allowing to solve the problems this formulation. A slower absorption tends to reduce C_{max} and so the intensity of the adverse events can be reduced. The slower rate of elimination ensures the retention of concentrations that are able to inhibit the viral replication over time up to the point of being able to delay the administration to a weekly application with equally effectiveness than the standard IFN. The significant increase in the permanence time of the molecule in the body justifies the possibility of a weekly administration of the product.

Objectives

Compared the pharmacokinetic properties of two formulations of peginterferon: the formulation A - peginterferon alpha-2a of 40 kDa, and formulation B - peginterferon alpha-2b of 48 kDa.

Methods

This randomized double-blind crossover phase I study, conducted in a single center with 31 healthy male volunteers aged 19 to 35 years in two phases of 14 consecutive days each and a five-week wash-out period between each subcutaneous administration of 180 µg of one of the formulations. The main variable was the serum peginterferon concentrations in 15 samples collected during the study using an enzyme immunoassay (EIA).

Results

There were no differences between the two formulations in magnitude parameters (C_{\max} ($p=0,318$), $AUC_{(0-336)}$ ($p=0,464$)) or absorption parameters ($CAV_{(0-336)}$ ($p=0,384$), MAT ($p=0,299$)). The analysis of time parameters revealed significantly longer times for formulation B than for formulation A (T_{\max} : 73 vs. 54 h ($p=0,0010$); MRT : 133 vs. 115 h ($p=0,0324$); k_e : 0.008 vs. 0.009 h^{-1} ($p=0,0153$); $t_{1/2}$: 192 vs. 118 h ($p=0,0218$)).

Conclusion

The pharmacokinetic profile of formulation B were similar to those of formulation A in what refers to magnitude parameters and different for time parameters. Further studies should be conducted to evaluate the clinical implications of these findings.

Keywords:

Pharmacokinetics, alfapeginterferon, Phase I

INTRODUCTION

To study the pharmacokinetics of a drug is an important step to understand its behavior and action in the organism. Several characteristics influence the kinetic behavior of the drug. Almost every group of drugs available today were the object of attempts to modify some of its characteristics with the aim to produce a stable product that, after administration, provides the desired therapeutic response in patients. The main focus of all these changes lies with improving the drug pharmacokinetics.

This study discusses the pharmacokinetic behavior of a drug molecule of protein nature attached to a chemical structure that belongs to the family of polyethylene glycol (PEG). The pegylation process is a method to modify the protein structure in order to minimize many of the limitations associated with therapeutic proteins (eg. short half-life, immunogenicity, poor stability)⁽¹⁾. The result is an increment in the permanence time of the drug in the organism. This bonding process of a protein with one of the PEG is called pegylation and the new product is called pegylated derivative.

The pegylated molecules lack of pharmacological activity and prove to be very suitable for major changes in various parts of its structure⁽¹⁾. However, depending on the size and the nature of the polyethylene glycol (PEG) portion, the variations of pharmacokinetic parameters may change significantly. Usually the bigger the size of the PEG, used to attach a drug, the slower the rate of drug elimination from the body. This fact supposes that maintaining plasma concentrations of the pegylated drug for a longer period of time, what means that the drug may be administered with longer intervals. On the other hand, the higher the number of places in a molecule with a PEG, the greater the

possibility that there are interferences in the pharmacological activity. Achieving the proper balance is, therefore, essential to achieve therapeutic benefits.

Experience with different pegylated derivatives which were studied showed that all of them, in comparison to the non-pegylated drug, had: a higher physical and thermal stability⁽²⁻⁴⁾, a lower susceptibility to enzymatic degradation⁽⁵⁾, an increased solubility^(6,7), a reduced plasma clearance with the corresponding increase of the elimination half-life⁽⁸⁻¹¹⁾, a reduction of the immunogenicity⁽¹²⁻¹⁵⁾ and the antigenicity and, finally, an improvement of the toxicity profile⁽¹⁶⁾. These effects are due to modifications on the original drug conferring different physicochemical properties including conformational changes, steric interferences, changes in the properties of electrostatic placement, increasing the lipophilia, etc. These changes entail major changes in the behavior of the pegylated derivative, which focus on the pharmacokinetic behavior.

A pegylated drug allows the reduction in the number of applications, this fact makes it very attractive for drugs that have a reduced elimination half-life and, therefore, that require administrations at short intervals. Another advantage of pegylation is evident when one reduces the possible toxicity associated to high peaks of plasma levels.

The monotherapy with pegylated IFN, which was approved on November 2000 by the Food and Drug Administration (FDA) to be used to treat patients with chronic hepatitis C, achieved 40% of sustained virologic response. At the same year, its combination with ribavirin was approved, raising the sustained virologic response to 61%⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. The pegylated IFN is also recommended to treat chronic hepatitis B⁽²⁰⁾.

Administration by intramuscular or subcutaneous injection in the conventional manner entail a very fast absorption reaching a peak of serum levels between 7-12 hours, a wide distribution and a high plasma clearance, which determines a very short elimination half-life, 4-16 hours, so that within 24 hours after administration there is little or no circulating IFN. This pharmacokinetic profile justifies the existence of significant and fast oscillations in the concentrations of IFN alpha, which have been associated with flu-like symptoms that are typical of the drug administration. Beyond that, the reduced effectiveness time would allow, at least until the administration interval is not set, the replication of the virus during periods when the product concentrations were decreased⁽²¹⁾.

The interferon alfa pegylation solves the great problems from nonpegylated INF formulations. By modifying the pharmacokinetics through a slower absorption, a lower volume distribution and the reduction of the product clearance, it was possible to increase the molecule residence time in the body, which justifies the weekly administration of the INF.

Currently, there are two versions of peginterferon alfa in the market. The peginterferon alfa-2b is characterized by a connection to the PEG with molecular weight of 12 kDa and a simple linear structure, where the links between the two molecules is a ester bond, which is located on a histidine residue. Its elimination is via renal⁽²²⁾. The peginterferon alfa-2a is bigger spatially and is characterized by two PEG branched chains, each one with 20 kDa molecular weight. The covalent bond involving a lysine residue at the junction with the PEG makes it more resistant and capable of being presented in liquid form. The drug is displayed at a dose of 180 µg and the remarkable

decrease in the distribution volume reached after the administration allows its use with a uniformly dose without body weight adjustment.

The development of a new molecule IFN alfa-2b human recombinant conjugated to a branched PEG 48 kDa showed appropriate thermal stability and less susceptibility to degradation by proteases when compared to the non-modified protein⁽²³⁾. Preclinical studies, performed with Formulation B, have shown a significantly higher blood half-life than the non-pegylated IFN in pharmacokinetic studies in animals. It is assumed that all peginterferons alfa known are different from each other in this respect. In any case, the binding of interferon alfa-2 to a branched PEG molecule with four chains of 12 kDa resulted in a different chemical structure from its origin.

One of the most important aspects is the creation, during the making of peginterferon alfa, of various position isomers, which, by definition, have different biological activity, because the PEG binding to different locations of the protein causes different interference between cells receptor and the IFN. This fact can also affect the pharmacokinetic behavior from peginterferon alfa. Additionally, it should be appreciated that between the commercial reference product (Formulation A - interferon alfa-2a) and the developed new product Formulation B (interferon alfa-2b), the only difference with respect to protein structure constitutes one amino acid change. This factor does not affect the kinetics from the non-pegylated product, but does not rule out that this union may affect the PEG, causing some kind of structural change.

Considering the incidence and prevalence of hepatitis C viral infection in Brazil, the therapeutic efficacy of pegylated interferons and the high cost of these drugs, it is necessary to study alternatives that offer a more favorable cost-benefit ratio to be used in the Brazilian health system, and also to develop

these needed technologies to the Health System would decrease its dependence on imported drugs. Thus, after the development of a formulation with peginterferon alfa-2b conjugated with a PEG molecule with four branched chains of 12 kDa, with satisfactory results in pre-clinical trials, it was decided to perform a phase I clinical trial to evaluate its pharmacokinetic behavior, biological safety and pharmacodynamics compared with similar peginterferon alfa-2a available commercially.

The main objective of this study is to compare the pharmacokinetics from the two formulations of interferon alfa (2a and 2b) conjugated to polyethylene glycol of different molecular sizes (40 kDa and 48 kDa respectively) in healthy volunteers, assuming strict regulatory criteria by the following parameters: maximum concentration (C_{max}), area under the curve (AUC); maximum time (T_{max}); absorptiometry (CAV), half-life time ($t_{1/2}$), clearance (CL), distribution volume (VD); mean residence time (MRT); final elimination constant (K_e); mean absorption time (MAT); duration value of the mean concentration (HVD).

METHODS

Study design

This is a Phase I clinical trial, randomized, double-blind and crossover, designed for 32 healthy volunteers with the aim to evaluate the pharmacokinetic parameters of peginterferon alfa-2a 40 kDa and 48 kDa peginterferon alfa-2b.

The randomization was planned to generate two groups of 16 volunteers, which would received the products in two separate steps over the five weeks of wash-out, time determined from the data obtained in a similar study, which used the peginterferon alfa-2a of 40 kDa as a reference, the half-life was found to be approximately 72 hours⁽²⁴⁾. The execution of the study was divided into four non-simultaneous groups. The subjects were admitted in a hospital and

kept under medical supervision during the first 96 hours of the study period at each stage. Later, they attended the institution for regular blood samples, which were taken up to complete 336 hours (14 days). During the time of the study 15 blood samples per individual were taken at each step.

The comparison of Formulation B (produced in Brazil) with Formulation A (commercially available) was justified, because both have similar molecular weights and pharmacokinetics results, which justifies the use of the same dose and dosage. Studies have shown that there are no significant differences in effectiveness between interferon alfa-2a and interferon alfa-2b ⁽²⁴⁻²⁶⁾.

Subject selection

The study included of male healthy subjects that spontaneously answered the call of pickup for the test, which was issued by the Center for Clinical Research. The protocol was approved by the Research Ethics Committee/HCPA.

Diagnostic criteria

The healthy individuals had to comply the following criteria to be considered: no history of chronic diseases, oral health preserved evaluated by the dentist, no evidence of psychological disorders evaluated by a psychiatrist, no history of acute illness in the last 30 days, no significant clinical symptoms and signs at physical examination, all laboratory tests within normal limits; all imaging exams within normal limits; seronegative for HIV and hepatitis B and C virus determination tests.

As inclusion criteria, were eligible the volunteers who signed an informed consent form; Who complied with the previous diagnostic criteria; Male; With age between 18 and 35 years old; With body mass index between 20 and 25.9; Individuals without history of hypersensitivity to interferon alfa, to products

derivatives of Escherichia coli, to PEG or any salts present in this preparation; Individuals that were not treated with any type of interferon in any time prior to the test; Individuals without personal medical history of chronic diseases such as autoimmune diseases, liver failure, decompensated cirrhosis, heart disease, kidney failure, diabetes mellitus, thyroid disorders, hemoglobinopathies, cytopenia, history of psychiatric disease, retinopathy, optic neuritis; acute infectious disease in the last 30 days; use of medication that alter immunity; drug allergy; surgical intervention during the 6 months prior to the start of the study; blood donation; alcoholism or current use of alcohol and nor illicit drugs; Individuals without the use of other illicit drugs in the last six months; participation in any clinical study with therapeutic intervention in the year prior to inclusion. As non-inclusion criteria was considered the onset of any of the items mentioned above

The criteria for discontinuation of study: Exit of the study by individual will; serious adverse events or events that could be a risk to the volunteer in the first stage of the study.

Treatment

Interventions were performed according to the crossover design: 16 study subjects randomized to received 180 µg of Formulation A at phase I, were followed for 14 days and then had a period five weeks of wash-out. Then, in phase II, the same study subjects received 180 µg of Formulation B and were followed for 14 consecutive days. The same schedule was applied for the 16 subjects randomized to receive 180 µg of Formulation B. The peginterferon alfa dose was administered subcutaneously in the deltoid region with subjects at a 12 hours fasting. For the treatment of flu-like symptoms was provided administration of 750 mg acetaminophen as concomitant treatment. Ibuprofen

400 mg tablets or dipyron 500 mg for relief of adverse events were administered following medical decision.

Allocation method

Randomization was performed by the software "R" in one block and the list of allocation was not revealed to the team. The volunteers were randomized into two groups of 16. At the inclusion moment, a number was designated to each participant in a consecutively way.

Study blinding

Since the products presentations were distinct from each other, only the professional who administered the injections, a nurse (not blind), had knowledge of the product administered to each volunteer. The product subcutaneously in the right deltoid region through a folding screen, so that the patient could not see the product which was administered and the nurse could not identify the subject. The volunteer received the product application immediately after randomization in the first step. In step two, the numbering was necessarily the same as the previous step with the subjects receiving the product comparator. The medical examiners, monitors and lab team also analyzed the samples blindly. The random list that during the execution of the assay was preserved and protected in the sponsor has been decoded in groups A and B to perform the statistical analysis. Only a professional from the Quality Assurance area and the statistician from the sponsor had access to the randomization list. During the conduct of the study, there was no need to open the randomization code before the final data analysis.

Evaluated pharmacokinetic parameters

The main variable was the concentration of peginterferon alfa in human serum, measured in times before and 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 120,

168, 216, 264 and 336 hours after administration of pegylated interferon alfa. The samples could be performed in a interval of five minutes before or after the scheduled time, without breaking the protocol.

Quantification of peginterferon alfa in the serum

The interferon alfa serum determination allows the comparison of the pharmacokinetics from the two products under study through the determination of parameters that describe the similarity between them. The ELISA test was used for the determination of interferon alfa. In this study we used an EIA commercialized by manufacturer BPL to non-pegylated human interferon alfa because there is no commercially available kit for quantitation of pegylated IFN.

Correction Factor for the determination of serum alfapeinterferona

To validate the detection of pegylated INF antibodies, which recognize conventional alfa IFN molecule, it was necessary to calculate a correction factor to correlate the determinations of pegylated and non-pegylated INF. The methodology consisted of determinate the most appropriate concentrations of peginterferon alfa-2a and 2b, so that when the ELISA assay was performed it would be possible to determinate the higher number of apparent concentrations with values close to the ones indicated by the Kit. The correction factors were determined for the concentration values based on the absorbance obtained with the EIA according to the type of the used molecule and serum dilution.

The evaluation took place in the following steps for each tested product: adjustment of real concentrations more appropriate for the comparison with the concentrations from the standard curve, recommended for the non-pegylated IFN; Determination the adjust method from the standard curve. Determination of the calculation method for the correction factor; Performance of the test, with all

determined parameters, and repeated, six times, by three different technicians (twice each one); Verification of linearity of the obtained results by adjusting lines of simple regression of actual concentrations by the concentrations apparent; Calculation of the final correction factor by the method chosen as the most appropriate, and by the other proposed methods, in order to compare the results.

In all cases, it is a biological assay, which is recognized to have great variation between the tests, the maximum acceptable variation coefficient was 25%. Moreover, for a repetition to be considered valid, it was necessary that at least three points of the curve to be considered acceptable. We also conducted the investigation of outliers (extreme values) through descriptive analysis and Box-plot graphs and these values, if any, were excluded from the final calculation of the correction factor. This determination was realized at the Immunobiologic Laboratory (LATIM) from the Bio-Manguinhos/FIOCRUZ.

The pharmacokinetic profiles of formulations A and B were defined by a calculation of the main pharmacokinetic parameters that describe the steps of the drug's absorption and elimination. The calculation of pharmacokinetic parameters was performed using the experimental serum values from peginterferon alfa considering a non-compartmental pharmacokinetic model. The following parameters were calculated: maximum concentration (C_{max}), area under the curve (AUC); maximum time (T_{max}); absorptiometry (CAV), half-life ($t_{1/2}$), clearance (CL); distribution volume (VD); mean residence time (MRT); final elimination constant (K_e); mean absorption time (MAT); duration value of the mean concentration (HVD)

STATISTICS

Sample size

Was used as reference sample to perform the calculation for this study the results of a comparative pharmacokinetic study⁽²⁴⁾ where a single dose of 180 to 16 healthy volunteers. Assuming a difference of up to 30%, loss follow-up 10%, alpha error of 0.10 and power of 80%, and taking into account the results obtained for CAV_{inf} , pharmacokinetic parameter, which is calculated from the ratio of two fundamental parameters - C_{max} and AUC, was calculated as necessary to include 32 volunteers. This number of subjects is within the number of individuals recommended by ANVISA and international regulatory agencies in the pharmacokinetic comparison studies.

Statistical Analysis

For the pharmacokinetics measurements C_{max} , $ASC_{(0-t)}$ and T_{max} , the measures of central tendency and dispersion for each group (mean, median, confidence interval 95% to the average, minimum and maximum values, standard deviation, quartiles class) for the original pharmacokinetic measures were estimated. The maximum range for differences between the means is established by the rule $+ / - 20\%$ of equivalence. We also evaluated the assumptions for parametric testing. It was verified fulfillment with the assumptions of normality (Shapiro-Wilk test). In discordant cases, changes were sought and the aim was achieved. The statistical analysis with the parameters that satisfy the alleged distributions was analyzed by the parametric method for cross drawings (ANOVA) and the confidence intervals of 90% and/or 95% according to Westlake for the difference between the pharmacokinetic parameters of both treatments.

For the other pharmacokinetic measures

Estimates of central tendency and dispersion measures (mean, median, confidence interval 95% to the average, minimum and maximum values, standard deviation, quartiles class) were calculated for each pharmacokinetic parameter. Analysis was performed by the Wilcoxon method with a confidence interval of 95%.

RESULTS

Data set evaluated

All analyzes were performed by intention to treat. The study design foresaw the inclusion of 32 volunteers, but meeting the inclusion criteria, a total of 31 volunteers were randomized. All volunteers were considered in demographic analyzes. The pharmacokinetic analyzes were performed with 28 volunteers, as there were three whose PEG-IFN serum were not detected in most of the collected samples in the second stage (Subject # 20, except for 36h; Subject # 21, except for 12, 24 and 36 hours; Subject # 31: throughout the profile).

Demographic and baseline characteristics

The demographic variables behavior of the volunteers showed that the study population was predominantly white (80,6%) with an average of 1.74 meters in height and 70.8 kg of body weight. The mean age was 26.1 years (19 to 35).

Table 1: Demographic characteristics of anthropological study volunteers.

Variables	Sequence AB (16)	Sequence BA (15)	Total (31)
Age	Mean \pm DP	25 \pm 5	26 \pm 5
	Median \pm SQ	25 \pm 9	26 \pm 9
	Minimum; Maximum	19; 32	19; 35

Weight	Mean \pm DP	72 \pm 6	69 \pm 8	70 \pm 7
	Median \pm SQ	71 \pm 8	71 \pm 12	71 \pm 10
	Minimum; Maximum	63; 83	53; 84	53; 84
Height	Mean \pm DP	174 \pm 4	174 \pm 6	174 \pm 5
	Median \pm SQ	171 \pm 6	173 \pm 5	174 \pm 5
	Minimum; Maximum	167; 184	165; 192	164; 185
Body mass index	Mean \pm DP	23,6 \pm 1.2	22,7 \pm 2.0	23,2 \pm 1,7
	Median \pm SQ	23,8 \pm 2.0	22,5 \pm 3.7	23,6 \pm 2,8
	Minimum; Maximum	20,8; 25,1	19,7; 25,8	19,7; 25,8
body surface	Mean \pm DP	1,86 \pm 0,09	1,83 \pm 0,13	1,85 \pm 0,11
	Median \pm SQ	1,86 \pm 0,16	1,83 \pm 0,16	1,84 \pm 0,15
	Minimum; Maximum	1,76; 2,04	1,57; 2,07	1,57; 2,07
Skin color	White	14 (87,5%)	11 (73,3%)	25 (80,6%)
	Black	2 (12,5%)	1 (6,7%)	3 (9,7%)
	Mestiça	0 (0%)	3 (20,0%)	(9,7%)

Pharmacokinetic results

Figure 1 shows the pharmacokinetic profiles, from the peginterferon alfa serum for both formulations.

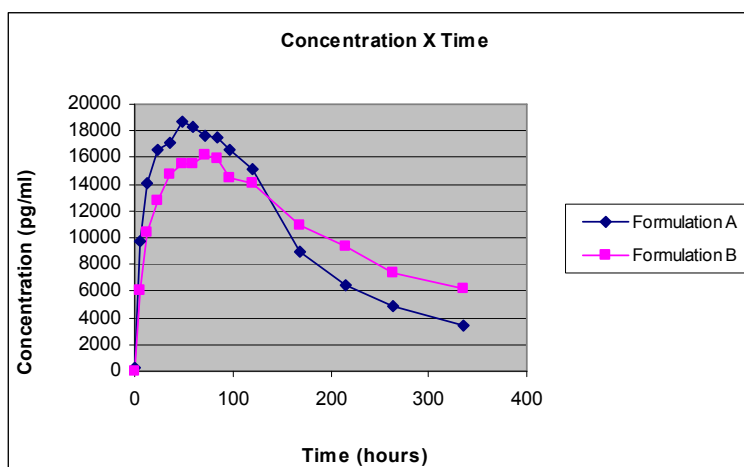


Figure 1: Average plasmatic concentration curves (pg/ml) X Formulations A and B times (hours)

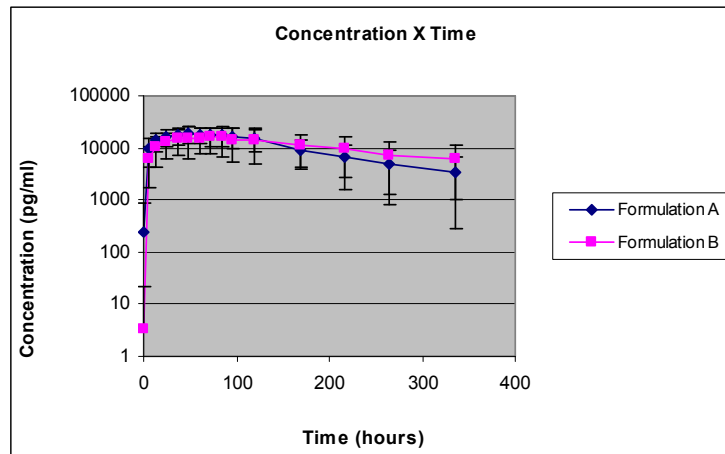


Figure 2: Average plasmatic concentration curves (pg/ml) X Formulations A and B times (hours) logarithmic.

These plots shows that the curves of both formulations describe a behavior according to its structure Pegylation. In both cases the steps of absorption, elimination and the maximum concentration point are well defined. In spite of this, at first sight, it is noted that there are differences along the pharmacokinetic profile for which the formulation A has reached the maximum serum in less time and higher elimination speed from the body.

Table 2 presents the measures of central tendency and dispersion of pharmacokinetic parameters for formulations A and B. The statistical model theory was used and the results are shown in Table 3 also featuring the measures of central tendency and dispersion from the pharmacokinetic parameters. These parameters are corroborated by the pharmacokinetic analysis performed only by the mathematical model.

Table 2: Statistics of mean pharmacokinetic parameters

Parameters	Formulation A		Parameters	Formulation B		P-valor ANOVA
T_{max} (hours)	Mean	54	T_{max} (hours)	Mean	73	
	DP	18		DP	22	
	Median	48		Median	72	
	Minimum	24		Minimum	24	
	Maximum	96		Maximum	120	

	CV	33,3		CV	30,1	
C_{max} (pg/ml)	Mean	19960	C_{max} (pg/ml)	Mean	18630	0,3185
	DP	7066		DP	8641	
	Median	19019		Median	17489	
	Minimum	9437		Minimum	2527	
	Maximum	34264		Maximum	35833	
	CV	35,4		CV	46,3	
Ke (h^{-1})	Mean	0,009	Ke (h^{-1})	Mean	0,008	0,0153
	DP	0,007		DP	0,013	
	Median	0,006		Median	0,003	
	Minimum	0,002		Minimum	0,001	
	Maximum	0,027		Maximum	0,0714	
	CV	77,7		CV	162,5	
$T_{1/2}$ (hours)	Mean	118	$T_{1/2}$ (hours)	Mean	191,8	0,0218
	DP	69,3		DP	128,7	
	Median	113		Median	209,1	
	Minimum	25,3		Minimum	7,4	
	Maximum	311,8		Maximum	548,3	
	CV	58,7		CV	67,1	
$AUC_{(0-336)}$ (pg/h/ml)	Mean	3449752	$AUC_{(0-336)}$ (pg/h/ml)	Mean	3622281	0,4649
	DP	1562761		DP	2197201	
	Median	3198103		Median	3135326	
	Minimum	1111243		Minimum	186754	
	Maximum	6517569		Maximum	8108909	
	CV	45,3		CV	60,6	
$AUC_{(0-inf)}$ (pg/h/ml)	Mean	4412575	$AUC_{(0-inf)}$ (pg/h/ml)	Mean	5979501	0,0053
	DP	2373083		DP	4066639	
	Median	3561666		Median	5745175	
	Minimum	1341214		Minimum	192910	
	Maximum	11264812		Maximum	14972196	
	CV	58,7		CV	68,0	

Table 3: Non Compartmental Analysis (Statistical Model) from the pharmacokinetic measures of Formulations A and B

Parameters	Formulation A		Parameters	Formulation B		P-Valor ANOVA
$MRT_{(0-336)}$ (hours)	Mean	115	$MRT_{(0-336)}$ (hours)	Mean	133	0,0324
	DP	27		DP	37	
	Median	125		Median	150	
	Minimum	57		Minimum	50	
	Maximum	145		Maximum	185	
	CV	23,4		CV	27,8	
$CAV_{(0-336)}$	Mean	0,006	$CAV_{(0-336)}$	Mean	0,007	0,3843

	DP	0,002		DP	0,004	
	Median	0,006		Median	0,005	
	Minimum	0,004		Minimum	0,004	
	Maximum	0,011		Maximum	0,022	
	CV	33,3		CV	57,1	
MRT _(0-inf) (hours)	Mean	117	MRT _(0-inf) (hours)	Mean	300	0,0003
	DP	82		DP	172	
	Median	176		Median	324	
	Minimum	68		Minimum	52	
	Maximum	429		Maximum	701	
	CV	70,0		CV	57,3	
CAV _(0-inf)	Mean	0,005	CAV _(0-inf)	Mean	0,005	0,2702
	DP	0,002		DP	0,004	
	Median	0,005		Median	0,003	
	Minimum	0,002		Minimum	0,002	
	Maximum	0,01		Maximum	0,022	
	CV	40		CV	80	
MAT	Mean	28,1	MAT	Mean	30,9	0,2992
	DP	17		DP	13,1	
	Median	25,5		Median	28,1	
	Minimum	7,5		Minimum	8,4	
	Maximum	70,1		Maximum	59,8	
	CV	60,49822		CV	42,39482	
HVD (hours)	Mean	161	HVD (hours)	Mean	216	0,3591
	DP	38		DP	101	
	Median	162		Median	254	
	Minimum	88		Minimum	19	
	Maximum	229		Maximum	327	
	CV	23,6		CV	46,75926	

The longer time to reach maximal concentration (73 vs 54 hours) of Formulation B, combined to its largest average residence time ($MRT_{(0-336)} = 133$ hours vs. 115 hours), longer duration of the average concentration (HVD = 216 hours), longer half life ($t_{1/2} = 191$ hours) and shorter elimination constant ($K_e = 0.008$) contributed to its higher concentration levels than formulation A at the last evaluative point, assuming that this difference is statistically significant to infinity. The absorption of both products was similar according to the results from the absorption coefficient (CAV) and the mean absorption time (MAT). The variance analysis detected "formulation" effect (difference between the two

products) only in the case of T_{max} , $MRT_{(0-336)}$, Ke , $t_{1/2}$, $ASC_{(0-inf)}$, VD and $MRT_{(0-inf)}$.

In both periods, in a high percentage of subjects, the $ASC_{(0-336)}$ did not satisfy 80% of the $ASC_{(0-inf)}$. Thus, we believe that the results for the $ASC_{(0-inf)}$ and $MRT_{(0-inf)}$ should be disregarded for comparison purposes, because they have a high component of dependence to the fitted model in the elimination phase. This is due to larger values on the time parameters (T_{max} , $MRT_{(0-336)}$, $t_{1/2}$ and Ke) and VD for Formulation B.

In Table 4 we can observe the results of variance analysis taking into account all possible causes of present variations. Variability between subjects was detected for $ASC_{(0-336)}$, C_{max} , $MRT_{(0-336)}$, $CAV_{(0-336)}$, Ke , $AUC_{(0-inf)}$, VD , CL , $CAV_{(0-inf)}$. "Period" (step) effect was detected in the $MRT_{(0-336)}$, VD , $MRT_{(0-inf)}$ parameters. The residual effect appears in the parameter $MRT_{(0-336)}$ and $t_{1/2}$.

Table 4: ANOVA analysis results for the effect of each source of variation

	Source of the variation	SQ	gl	MQ	F	valor-P
C_{max}	Stage	50143,16	1	50143,16	0,0021	0,9639
	Subject	2741437530,21	27	101534723,34	4,2377	0,0002
Ke	Stage	2,18	1	2,18	3,7808	0,0627
	Subject	31,11	27	1,15	1,9987	0,0407
$T_{1/2}^{***}$	Stage	2,24	1	2,24	3,7561	0,0640
	Subject	28,29	26	1,09	1,8243	0,0686
$ASC_{(0-336)}$	Stage	3691961830588,00	1	3691961830588,00	2,7897	0,1069
	Subject	160863281115904,00	27	5957899300589,04	4,5019	0,0001
$ASC_{(0-inf)}$	Stage	15695831566224,00	1	15695831566224,00	3,7011	0,0658
	Subject	427680861353472,00	26	16449263898210,50	3,8788	0,0006
CL/F	Stage	0,39	1	0,39	1,2360	0,2764
	Subject	88,93	27	3,29	10,4335	0,0000
VD/F^{***}	Stage	1,06	1	1,06	7,7811	0,0097
	Subject	96,40	27	3,57	26,2770	0,0000
$MRT_{(0-inf)}$	Stage	72323,55	1	72323,55	5,4629	0,0277
	Subject	533401,71	26	20515,45	1,5496	0,1386
$MRT_{(0-336)}^{***}$	Stage	0,47	1	0,47	9,5060	0,0049*
	Subject	3,55	26	0,14	2,7586	0,0067*
$CAV_{(0-336)}$	Stage	0,22	1	0,22	3,1926	0,0856
	Subject	5,50	27	0,20	3,0101	0,0031
$CAV_{(0-inf)}$	Stage	0,23	1	0,23	0,7365	0,3989
	Subject	17,15	26	0,66	2,1201	0,0321
HVD	Stage	0,02	1	0,02	0,0685	0,7956

MAT	Subject	11,28	27	0,42	1,6799	0,0950
	Stage	0.0877030	1	0.0877030	0.2888250	0.5972132
	Subject	66840331,00	20	0.3342017	11.005.985	0.4188441

The detection in the residual effect "period" for the parameters $MRT_{(0-336)}$, VD and $t_{1/2}$ cannot be understood as an error in the planning of the "washout" period, since it was conducted from the reference product information, for which the result remained within the expected parameters.

GENERAL DISCUSSION

The peginterferon alfa products administration was performed satisfactorily, at the predicted time in all subjects. Clinical observations and sample collection were carefully timed and executed. The protocol deviations that occurred during the time of sample collection were minimal had no impact on the results. There was no need to violate the random list, for any of the individuals during the study.

The two groups were comparable for all demographic and baseline variables analyzed, with no significant differences in any of them. Also there was homogeneity between the groups in terms of baseline, clinical and laboratory parameters before administration of peginterferon alfa (time 0 hours) in both treatment periods.

From the results found on the literature, it was designed a period of five weeks wash-out⁽²⁴⁾. During this period, it was expected to occur total clearance of the drug in the systemic circulation and the disappearance of possible interferences in the induction of biological effects. However, we found a residual effect in Formulation B that should be considered in the design of studies to be conducted in the future with this product.

The selected parameters (AUC, C_{max} , T_{max} , CAV, Ke, CL, VD, $t_{1/2}$, MRT, MAT, HVD) describe all aspects of the peginterferon pharmacokinetic behavior. The product bioavailability always implies on the rate and the extent of absorption. In pharmacokinetic studies, C_{max} and T_{max} rates have been conventionally used as absorption characteristics^(29,30). These parameters are easy to interpret and compare with other data in the literature. However, for statistical analysis, T_{max} has the disadvantage of being a discrete variable, subject to non-parametric analysis by relying entirely on the experimental design. The C_{max} is considered indistinctly as a criterion for magnitude and as a rate of absorption; however it does not describe exactly the two processes. Although the biological interpretation is apparently easy, sometimes there are no criteria to decide when the difference between the two products is clinically important⁽³¹⁾. This way, it is important to include other variables such as MAT and CAV which can describe more accurately the phenomena of rate and the extent of absorption⁽³²⁾.

The sampling period in both steps of the study was accomplished during the 336 hours (14 days) to ensure that they cover, at each stage, at least 80% of the area under the plasma concentration curve extrapolated to infinity. The longer pharmacokinetic behavior found in Formulations prevented it to fulfill this purpose in various subjects. This finding is far from being a limitation to the study, but it represents the logical outcome of the first pharmacokinetics evaluations from the new product, with no consequences for achieving the objective of the study, and should be taking into consideration for the design of future studies with this same application.

The selected dose (180 μ g) coincides with the dose used in clinical practice for the use of the reference product (Formulation A) and it was

proposed for the Formulation B, because of the similarity in molecular weight observed in the two products⁽²³⁾. Although the protein quantitative is the same for both products, the final volume used was different. Formulation A presents this amount in 0.5 ml, whereas Formulation B presents it in 1 ml. With this dose, it is provided a satisfactory detection of interferon alfa titers in the serum to calculate the pharmacokinetic parameters and the appropriate safety and tolerability profile associated.

The pharmacokinetic profile from the mean concentration levels of serum peginterferon alfa, for the products, showed that Formulation B serves the expected behavior for its nature and remain detectable in peripheral blood within two weeks after subcutaneous administration⁽²³⁾. Although there were some differences in pharmacokinetic curves from both products, it is important to emphasize the similar behavior in its bioavailability, and that there were no differences in the absorption fraction (CAV), nor on the mean absorption time and transport from the site of administration to the systemic circulation (MAT).

For these types of products, which aim to obtain minimum effective for long periods of time and reduce the number of applications, the most important pharmacokinetic parameters are those which indicate prolonged residence in the body and not those that reflect the magnitude of the absorbed drug⁽²¹⁾. The comparisons of pharmacokinetic parameters from both products show clear advantages of Formulation B due to its much longer circulating time in the organism. These results are explained by the difference between the molecular weight and structure of the molecules of PEG-IFN.

The T_{max} obtained was higher for the Formulation B. In prolonged pharmacokinetic studies the difference between 48 and 72 hours do not have clinical relevance. This parameter has a discrete character dependent on the

fixed time and not on a continuous characterization throughout all the sample evaluation period. Therefore, it is of minor interest to compare with other parameters that characterize the absorption and elimination rates⁽³³⁾.

The slower elimination of Formulation B, which was demonstrated with a K_e 2.3 times lower than Formulation A, added to the extension of the MRT and HVD allow us to distinguish the kinetics obtained, which can be explained by the chemical and spacial structure of the products⁽³³⁾.

The pharmacokinetic differences between the two products were given mainly to the "formulation." effect. The substantial pharmacokinetic differences between one step and another were observed only in three subjects with no detectable serum levels in the serum after administration of Formulation B. This result may be related to the idiosyncrasies of each subject, the absorption variability (differences at the application site), intrinsic metabolic induction, varying levels of binding components (soluble circulating receptors, plasma proteins associated with the cell receptor), and (or), variability in speed or degradation pattern. The dose (180 µg) secured detectable levels of PEG-IFN in the serum by EIA technique, including at 336 hours after administration. We can also say that this dose allowed a proper comparison of the pharmacokinetics between the products because of the induced levels for each particular variable.

Results impact

The demonstration of the pharmacokinetics properties from pegylated interferon alfa represented the fulfillment of the main objective and therefore is considered acceptable in its methodological validity.

Given the characteristics of this phase I clinical study, which compared, in controlled conditions, the pharmacokinetics of different products in healthy

volunteers, its results can only be generalized, with certainty, to populations with similar characteristics to the selection criteria included in this study, ie, male subjects, healthy with certain physical characteristics.

In this study we analyzed the pharmacokinetics similarity degree between a new product of peginterferon alfa-produced in Brazil and its similar reference. Because it is a phase I study, in healthy volunteers, the medical impact social and economical will be reflected in future clinical and regulatory actions needed to complete the registration approval of the product that may be useful to society as a whole.

Immediately, the results from this clinical trial allow to define the design of the clinical trial phase II-III to assess and confirm the evidence of efficacy in patients with chronic hepatitis C. This disease of high prevalence worldwide, represents the main therapeutic indication of interferon alfa. In Brazil, the sanitary registration of Formulation B will feed the domestic market demand, increase health and quality of life levels and reduce or replace expensive imports of similar products, since the high cost makes its use limited to a part of the population.

The pharmacokinetic results of the study may only be applied to interferon alpha-2 recombinant conjugated to the branched polyethylene glycol (PEG) of molecular weight from 40,000 to 48,000 daltons.

GENERAL CONCLUSIONS

The aim of the study to show that Formulation B (pegylated IFN alfa-2b 48 kDa) has the expected pharmacokinetic profile similar to that of Formulation A as the concentration parameters. It was demonstrated that Formulation B remains in the body for a longer period of time, as shown by the statistically

significant difference in the variables of time, such as $t_{1/2}$, MRT, K_e and T_{max} , which indicates a slower elimination.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Harris JM, Chess RB. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov.* 2003 Mar;2(3):214-21. PubMed PMID: 12612647. eng.
2. Suzuki T, Kanbara N, Tomono T, Hayashi N, Shinohara I. Physicochemical and biological properties of poly(ethylene glycol)-coupled immunoglobulin G. *Biochim Biophys Acta.* 1984 Jul;788(2):248-55. PubMed PMID: 6743669. eng.
3. Baillargeon MW, Sonnet PE. Lipase modified for solubility in organic solvents. *Ann N Y Acad Sci.* 1988;542:244-9. PubMed PMID: 3228234. eng.
4. Hadley KB, Sato PH. Catalytic activity of administered gulonolactone oxidase polyethylene glycol conjugates. *Enzyme.* 1989;42(4):225-34. PubMed PMID: 2517112. eng.
5. Cao SG, Zhao QY, Ding ZT, Ma L, Yu T, Wang JH, et al. Chemical modification of enzyme molecules to improve their characteristics. *Ann N Y Acad Sci.* 1990;613:460-7. PubMed PMID: 2075996. eng.
6. Chen RH, Abuchowski A, Van Es T, Palczuk NC, Davis FF. Properties of two urate oxidases modified by the covalent attachment of poly(ethylene glycol). *Biochim Biophys Acta.* 1981 Aug;660(2):293-8. PubMed PMID: 7197160. eng.
7. Katre NV, Knauf MJ, Laird WJ. Chemical modification of recombinant interleukin 2 by polyethylene glycol increases its potency in the murine Meth A sarcoma model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Mar;84(6):1487-91. PubMed PMID: 3494243. Pubmed Central PMCID: PMC304459. eng.

8. Ho DH, Brown NS, Yen A, Holmes R, Keating M, Abuchowski A, et al. Clinical pharmacology of polyethylene glycol-L-asparaginase. *Drug Metab Dispos.* 1986 May-Jun;14(3):349-52. PubMed PMID: 2872037. eng.
9. Knauf MJ, Bell DP, Hirtzer P, Luo ZP, Young JD, Katre NV. Relationship of effective molecular size to systemic clearance in rats of recombinant interleukin-2 chemically modified with water-soluble polymers. *J Biol Chem.* 1988 Oct;263(29):15064-70. PubMed PMID: 3049599. eng.
10. Mast AE, Salvesen G, Brucato FH, Schnebli HP, Pizzo SV. Polyethylene glycol modification of serpins improves therapeutic potential. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1990 May;371 Suppl:101-9. PubMed PMID: 2400571. eng.
11. Satake-Ishikawa R, Ishikawa M, Okada Y, Kakitani M, Kawagishi M, Matsuki S, et al. Chemical modification of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor by polyethylene glycol increases its biological activity in vivo. *Cell Struct Funct.* 1992 Jun;17(3):157-60. PubMed PMID: 1379521. eng.
12. Davis S, Abuchowski A, Park YK, Davis FF. Alteration of the circulating life and antigenic properties of bovine adenosine deaminase in mice by attachment of polyethylene glycol. *Clin Exp Immunol.* 1981 Dec;46(3):649-52. PubMed PMID: 7337981. Pubmed Central PMCID: PMC1536305. eng.
13. Abuchowski A, Kazo GM, Verhoest CR, Van Es T, Kafkewitz D, Nucci ML, et al. Cancer therapy with chemically modified enzymes. I. Antitumor properties of polyethylene glycol-asparaginase conjugates. *Cancer Biochem Biophys.* 1984 Jun;7(2):175-86. PubMed PMID: 6467175. eng.

14. Tsuji J, Hirose K, Kasahara E, Naitoh M, Yamamoto I. Studies on antigenicity of the polyethylene glycol (PEG)-modified uricase. *Int J Immunopharmacol*. 1985;7(5):725-30. PubMed PMID: 2412977. eng.
15. Nucci ML, Olejarczyk J, Abuchowski A. Immunogenicity of polyethylene glycol-modified superoxide dismutase and catalase. *J Free Radic Biol Med*. 1986;2(5-6):321-5. PubMed PMID: 2439563. eng.
16. Yokoyama M, Miyauchi M, Yamada N, Okano T, Sakurai Y, Kataoka K, et al. Characterization and anticancer activity of the micelle-forming polymeric anticancer drug adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer. *Cancer Res*. 1990 Mar;50(6):1693-700. PubMed PMID: 2306723. eng.
17. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*. 2001 Sep 22;358(9286):958-65. PubMed PMID: 11583749.
18. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL, Jr., et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2002 Sep 26;347(13):975-82. PubMed PMID: 12324553.
19. Ferenci P. Peginterferon alfa-2a (40KD) (Pegasys) for the treatment of patients with chronic hepatitis C. *Int J Clin Pract*. 2003 Sep;57(7):610-5. PubMed PMID: 14529063. eng.
20. Robins GW, Scott LJ, Keating GM. Peginterferon-alpha-2a (40kD): a review of its use in the management of patients with chronic hepatitis B. *Drugs*. 2005;65(6):809-25. PubMed PMID: 15819595. eng.

21. Lam NP, Neumann AU, Gretch DR, Wiley TE, Perelson AS, Layden TJ. Dose-dependent acute clearance of hepatitis C genotype 1 virus with interferon alfa. *Hepatology*. 1997 Jul;26(1):226-31. PubMed PMID: 9214474. eng.
22. Peginterferon alfa-2b product monograph.
23. Ramon J, Saez V, Baez R, Aldana R, Hardy E. PEGylated interferon-alpha2b: a branched 40K polyethylene glycol derivative. *Pharm Res*. 2005 Aug;22(8):1374-86. PubMed PMID: 16078148. eng.
24. García-García I, González-Delgado CA, Valenzuela-Silva CM, Díaz-Machado A, Cruz-Díaz M, Nodarse-Cuní H, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic comparison of two "pegylated" interferon alpha-2 formulations in healthy male volunteers: a randomized, crossover, double-blind study. *BMC Pharmacol*. 2010;10:15. PubMed PMID: 21092287. Pubmed Central PMCID: PMC3001701. eng.
25. Bruno R, Sacchi P, Scagnolari C, Torriani F, Maiocchi L, Patruno S, et al. Pharmacodynamics of peginterferon alpha-2a and peginterferon alpha-2b in interferon-naïve patients with chronic hepatitis C: a randomized, controlled study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007 Aug;26(3):369-76. PubMed PMID: 17635371. eng.
26. Garcia-Garcia I, Gonzalez-Delgado CA, Valenzuela-Silva C, Hernandez-Bernal F, Ferrero-Bibilonia J, Soto-Hernandez R, et al. Bioequivalence of two recombinant interferon alpha-2b liquid formulations in healthy male volunteers. *Drugs R D*. 2004;5(5):271-80. PubMed PMID: 15357626. eng.
27. Schulz HU, Steinijans VW. Striving for standards in bioequivalence assessment: a review. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*. 1991 Aug;29(8):293-8. PubMed PMID: 1743802. eng.

28. Steinijans VW, Hauschke D, Jonkman JH. Controversies in bioequivalence studies. *Clin Pharmacokinet.* 1992 Apr;22(4):247-53. PubMed PMID: 1606785. eng.
29. Lacey LF, Keene ON, Duquesnoy C, Bye A. Evaluation of different indirect measures of rate of drug absorption in comparative pharmacokinetic studies. *J Pharm Sci.* 1994 Feb;83(2):212-5. PubMed PMID: 8169791. eng.
30. Schall R, Luus HG. Comparison of absorption rates in bioequivalence studies of immediate release drug formulations. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol.* 1992 May;30(5):153-9. PubMed PMID: 1592542. eng.
31. Reddy KR. Development and pharmacokinetics and pharmacodynamics of pegylated interferon alfa-2a (40 kD). *Semin Liver Dis.* 2004;24 Suppl 2:33-8. PubMed PMID: 15346244. eng.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo principal de qualquer ensaio clínico é que os sujeitos de pesquisa incluídos possam obter um benefício de sua participação no estudo. Por se tratar de um estudo de fase I, em voluntários sadios, o impacto médico social e econômico será refletido nas futuras ações clínicas e regulatórias necessárias para concluir a aprovação do registro do produto que poderá ser útil à sociedade como um todo.

De forma imediata, os resultados deste ensaio clínico permitem definir o desenho do ensaio clínico fase II-III destinado a avaliar e ratificar os elementos de eficácia em pacientes com hepatite C crônica. Esta doença de elevada prevalência mundial, representa a principal indicação terapêutica da alfainterferona. No caso do Brasil, o registro sanitário da Formulação B, produzida no Brasil, permitirá atender a demanda do mercado nacional, aumentar os níveis de saúde e qualidade de vida da população e reduzir ou substituir as caras importações de produtos similares, que dado ao elevado custo, torna seu uso limitado para uma parte da população.

Portanto, recomenda-se continuar o desenvolvimento clínico com a realização de um estudo de fase II e III avaliando a farmacocinética, farmacodinâmica e segurança em doses repetidas em pacientes portadores de hepatite C. Além disso, recomenda-se analisar diferentes esquemas de dosificação que permitam avaliar a eliminação do organismo da formulação B.

ANEXOS

ANEXO A

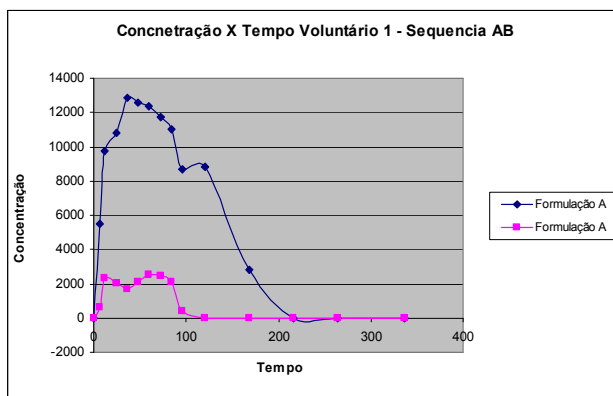
Tabela 1: Medidas farmacocinéticas dos indivíduos que receberam a Formulação A.

Concentração plasmática alfapeginterferona-2a 40 kDa - Formulação A								
Voluntário	Período	Sequência	T_{max}	C_{max}	K_{el}	T_{1/2}	ASC₀₋₃₃₆	ASC_{inf}
1	1	AB	36	12880,56	0,0170	40,8	1586137,4	1750206,7
2	1	AB	24	25242,79	0,0052	133,1	3102110,1	3561666,2
3	2	BA	48	13171,88	0,0042	166,2	2671898,9	3560090,0
4	2	BA	60	22735,29	0,0083	83,4	3727898,0	4088286,6
5	1	AB	84	13762,99	0,0215	32,3	1759092,7	1869886,0
6	2	BA	60	21718,41	0,0041	167,1	4130765,4	5508096,7
7	2	BA	48	28828,92	0,0049	140,4	4465519,4	5386831,8
8	1	AB	48	9437,16	0,0003	2000,7	1111243,4	25684172,5
9	2	BA	36	14596,21	0,0194	35,7	2259586,4	2287869,9
10	1	AB	48	24269,1	0,0046	152,1	5128148,2	6554475,6
11	2	BA	48	30268,13	0,0044	158,9	6016693,5	7833645,0
12	1	AB	48	22025,57	0,0257	27,0	2555715,8	2655941,7
13	2	BA	48	20788,38	0,0032	216,3	4214504,3	6198445,7
14	1	AB	60	10077,65	0,0030	234,0	1186903,9	1341214,2
15	1	AB	72	17902,64	0,0076	91,0	2965173,2	3284566,9
16	2	BA	96	16763,75	0,0044	157,1	3542242,7	4768196,2
17	2	BA	48	20136,67	0,0051	135,6	3947587,0	4868192,3
18	2	BA	36	34264,27	0,0078	88,7	6517569,0	7358986,6
19	2	BA	72	32196,07	0,0041	170,4	6447463,1	8671945,6
22	1	AB	48	30066,38	0,0121	57,5	4093839,3	4994270,1
23	2	BA	60	28113,49	0,0022	311,8	6261985,4	11264812,3
24	1	AB	48	17489,81	0,0071	97,6	3150612,0	3500149,6
25	1	AB	48	21313,06	0,0158	44,0	3268353,0	3514316,2
26	1	AB	36	14116,03	0,0274	25,3	1358267,3	1514335,2
27	2	BA	36	10943,71	0,0051	134,8	1941852,5	2365022,2
28	2	BA	96	15977,78	0,0077	90,4	3245595,2	3637774,3
29	1	AB	72	15836,59	0,0061	113,2	3080847,6	3547087,1
30	2	BA	48	13972,62	0,0080	86,7	2855459,9	3253220,5

Tabela 2: Medidas farmacocinéticas dos indivíduos que receberam a Formulação B.

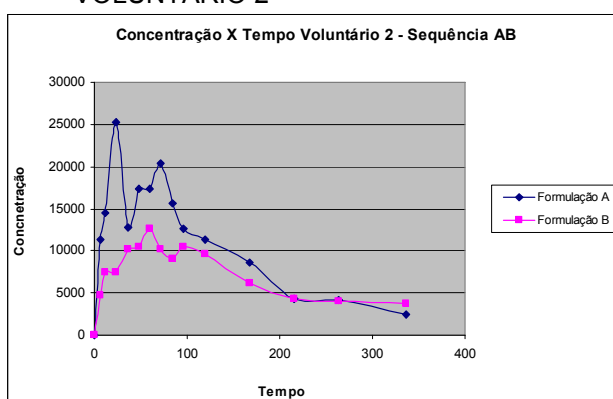
Concentração plasmática alfapeginterferona-2b 48 kDa - Formulação B								
Voluntário	Período	Sequência	T_{max}	C_{max}	K_{el}	T_{1/2}	ASC₍₀₋₃₃₆₎	ASC_(0-inf)
1	2	BA	60	2527,43	0,0714	9,7	186754,9	192910,0
2	2	BA	60	12569,15	0,0013	548,2	2227694,5	5162483,3
3	1	AB	84	13654,39	0,0021	328,7	3137617,3	6350416,9
4	1	AB	48	21255,39	0,0123	56,4	2370768,2	2536958,0
5	2	BA	84	15585,38	0,0074	93,0	3133035,5	3668977,6
6	1	AB	84	18687,6	0,0027	254,9	4495645,1	8048730,3
7	1	AB	84	15533,04	0,0037	189,0	3788300,3	5745175,4
8	2	BA	60	20118,67	0,0020	339,5	2169106,1	4304067,4
9	1	AB	72	12338,04	0,0132	52,6	1335032,4	1916581,0
10	2	BA	84	19616,6	0,0028	245,0	4297410,9	7751997,4
11	1	AB	72	29185,26	0,0038	184,3	6742470,5	9732108,0
12	2	BA	96	35743,84	0,0028	243,7	8089767,4	13647161,6
13	1	AB	84	18431,65	0,0141	49,1	2773240,7	3082362,7
14	2	BA	36	7429,45	0,0237	29,3	870224,6	880475,8
15	2	BA	120	9575,38	0,0026	264,9	2110628,7	5128071,9
16	1	AB	72	16548,17	0,0031	221,9	3648731,9	5790025,2
17	1	AB	84	21213,01	0,0027	254,7	4743129,5	7963583,8
18	1	AB	48	29236,45	0,0132	52,5	4553842,3	5073789,6
19	1	AB	120	26710,82	0,0018	380,1	6713470,8	14972196,3
22	2	BA	84	35832,86	0,0038	180,5	8108909,1	11875775,2
23	1	AB	72	33197,05	0,0027	260,7	7543221,7	13118600,5
24	2	BA	48	15361,2	0,0034	205,1	3414243,8	5332145,5
25	2	BA	84	21144,2	0,0032	215,7	5023345,7	7960915,4
26	2	BA	24	9297,01	0,0189	36,7	505253,2	617637,9
27	1	AB	36	26357,88	0,0056	124,4	2055591,8	2266803,7
28	1	AB	72	12483,02	0,0079	87,8	2205932,2	2387893,2
29	2	BA	96	11498,5	0,0020	343,9	2906135,5	6272683,2
30	1	AB	72	10535,35	0,0013	528,2	2274352,1	6987513,5

VOLUNTÁRIO 1



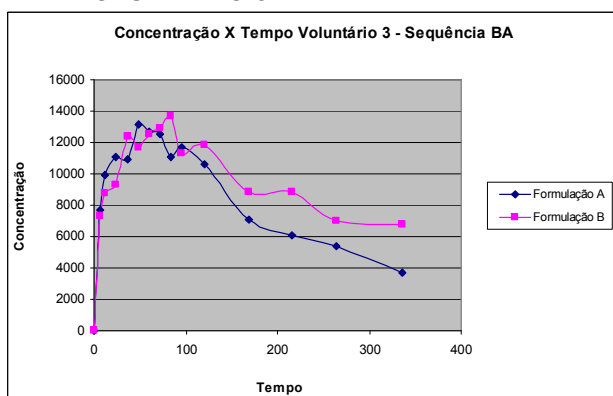
Parâmetro	Fármaco	
	Formulação A	Formulação B
T_{Max} (horas)	36	60
C_{Max} (pg/ml)	12880	2527
K_{el} (h^{-1})	0,016	0,071
$T_{1/2}$ (horas)	40	9,7
ASC_{0-336} (pg*h/ml)	1586137	1867547
ASC_{inf} (pg*h/ml)	1750206	192910

VOLUNTÁRIO 2



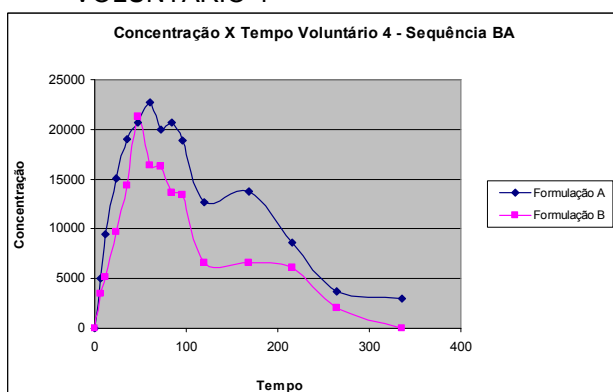
Parâmetro	Fármaco	
	Formulação A	Formulação B
T_{Max} (horas)	24	60
C_{Max} (pg/ml)	25242	12569
K_{el} (h^{-1})	0,005	0,001
$T_{1/2}$ (horas)	133	548
ASC_{0-336} (pg*h/ml)	3102110	2227694
ASC_{inf} (pg*h/ml)	3561666	5162483

VOLUNTÁRIO 3



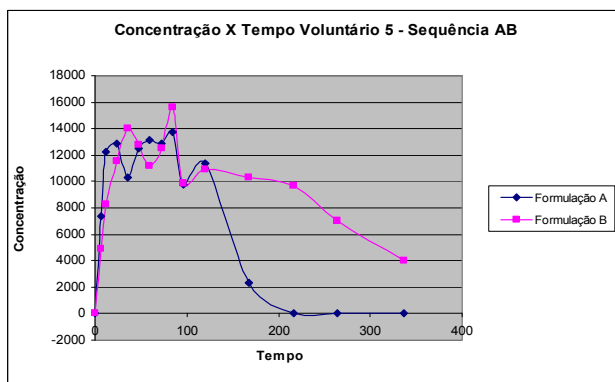
Parâmetro	Fármaco	
	Formulação A	Formulação B
T_{Max} (horas)	48	84
C_{Max} (pg/ml)	13654	13171
K_{el} (h^{-1})	0,004	0,002
$T_{1/2}$ (horas)	166	328
ASC_{0-336} (pg*h/ml)	2671898	3137617
ASC_{inf} (pg*h/ml)	350089	6350416

VOLUNTÁRIO 4



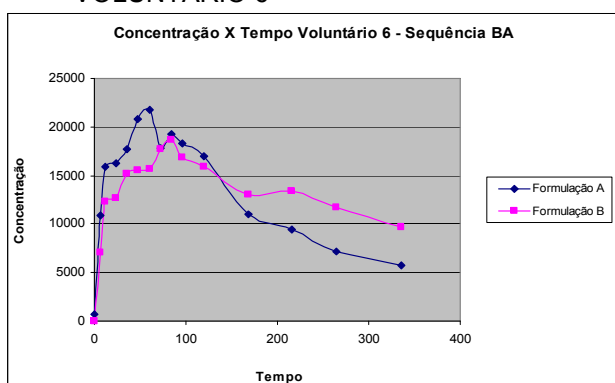
Parâmetro	Fármaco	
	Formulação A	Formulação B
T_{Max} (horas)	60	48
C_{Max} (pg/ml)	22735	21255
K_{el} (h^{-1})	0,008	0,012
$T_{1/2}$ (horas)	83	56
ASC_{0-336} (pg*h/ml)	3727898	2370768
ASC_{inf} (pg*h/ml)	4088286	2536958

VOLUNTÁRIO 5



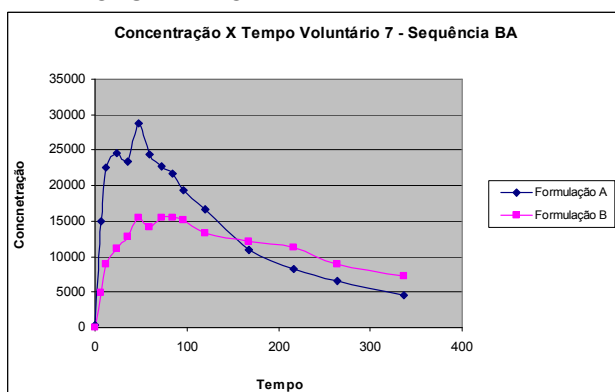
Parâmetro	Fármaco	
	Formulação A	Formulação B
T_{Max} (horas)	84	84
C_{Max} (pg/ml)	13762	15585
K_{el} (h^{-1})	0,021	0,007
$T_{1/2}$ (horas)	32	93
ASC_{0-336} (pg*h/ml)	1759092	3133035
ASC_{inf} (pg*h/ml)	1869886	3668977

VOLUNTÁRIO 6



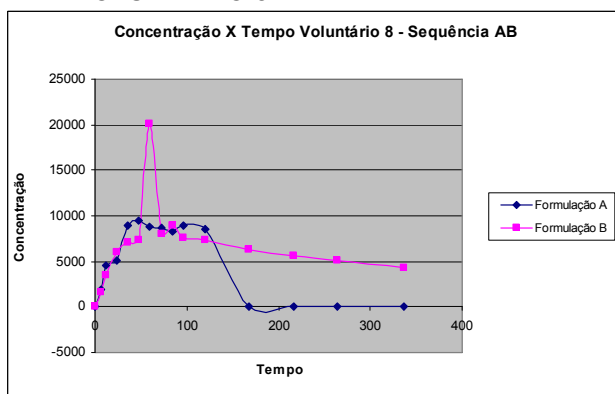
Parâmetro	Fármaco	
	Formulação A	Formulação B
T_{Max} (horas)	60	84
C_{Max} (pg/ml)	21718	18687
K_{el} (h^{-1})	0,004	0,002
$T_{1/2}$ (horas)	167	254
ASC_{0-336} (pg*h/ml)	4130765	4495645
ASC_{inf} (pg*h/ml)	5508096	8048730

VOLUNTÁRIO 7



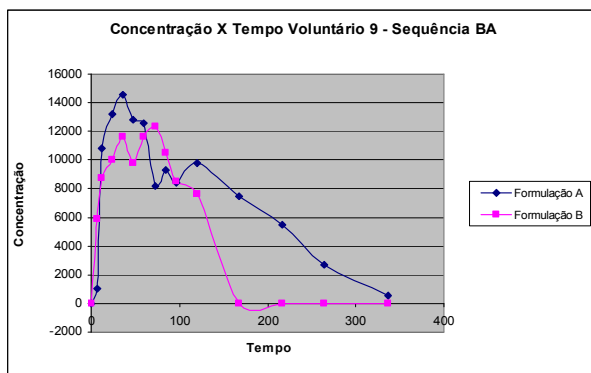
Parâmetro	Fármaco	
	Formulação A	Formulação B
T_{Max} (horas)	48	84
C_{Max} (pg/ml)	28828	15533
K_{el} (h^{-1})	0,004	0,003
$T_{1/2}$ (horas)	140	189
ASC_{0-336} (pg*h/ml)	4465519	3788300
ASC_{inf} (pg*h/ml)	5386831	5745175

VOLUNTÁRIO 8



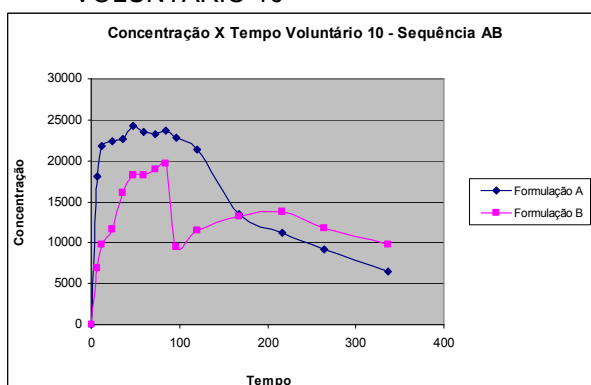
Parâmetro	Fármaco	
	Formulação A	Formulação B
T_{Max} (horas)	48	60
C_{Max} (pg/ml)	9437	20118
K_{el} (h^{-1})	0,0001	0,002
$T_{1/2}$ (horas)	4001	339
ASC_{0-336} (pg*h/ml)	1111243	2169106
ASC_{inf} (pg*h/ml)	1111243	4304067

VOLUNTÁRIO 9



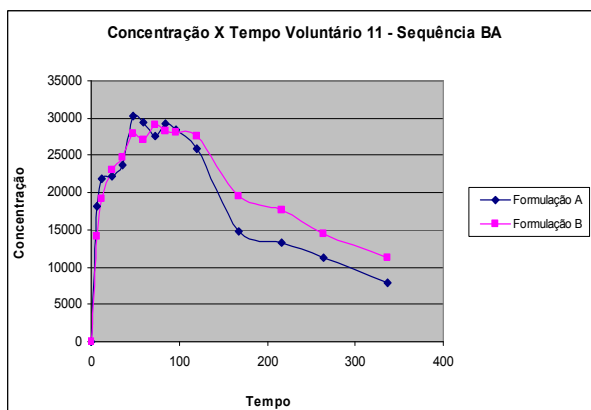
Parâmetro	Fármaco	
	Formulação A	Formulação B
T_{Max} (horas)	36	72
C_{Max} (pg/ml)	14596	14596
K_{el} (h^{-1})	0,019	0,019
$T_{1/2}$ (horas)	35	35
ASC_{0-336} (pg*h/ml)	2259586	2259586
ASC_{inf} (pg*h/ml)	2287869	2287869

VOLUNTÁRIO 10



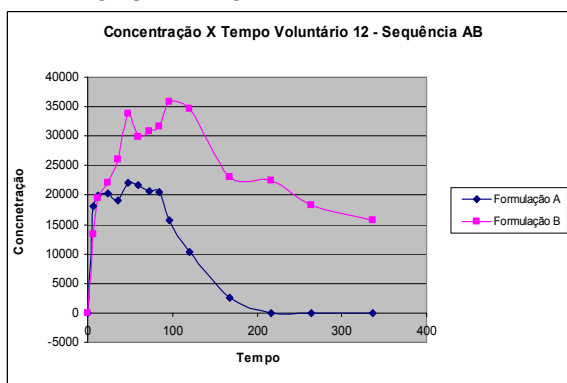
Parâmetro	Fármaco	
	Formulação A	Formulação B
T_{Max} (horas)	48	84
C_{Max} (pg/ml)	24269	19616
K_{el} (h^{-1})	0,004	0,002
$T_{1/2}$ (horas)	152	244
ASC_{0-336} (pg*h/ml)	5128148	4297410
ASC_{inf} (pg*h/ml)	6554475	7751997

VOLUNTÁRIO 11



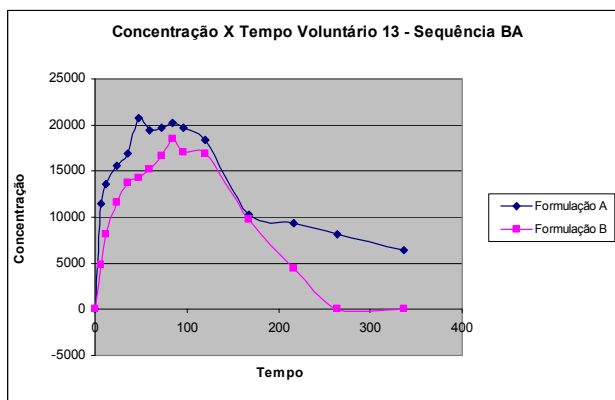
Parâmetro	Fármaco	
	Formulação A	Formulação B
T_{Max} (horas)	48	72
C_{Max} (pg/ml)	30268	29185
K_{el} (h^{-1})	0,004	0,003
$T_{1/2}$ (horas)	158	184
ASC_{0-336} (pg*h/ml)	6016693	6742470
ASC_{inf} (pg*h/ml)	7833644	9732107

VOLUNTÁRIO 12



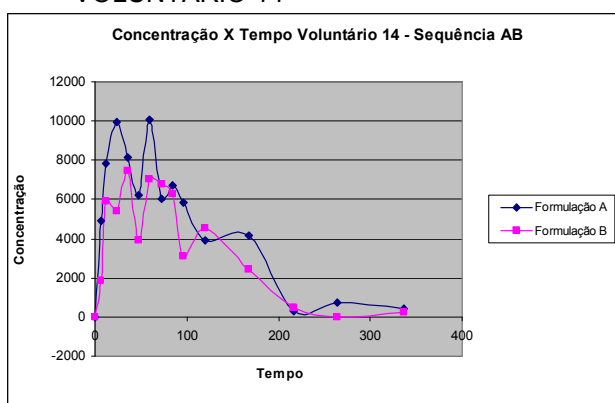
Parâmetro	Fármaco	
	Formulação A	Formulação B
T_{Max} (horas)	48	96
C_{Max} (pg/ml)	22025	35743
K_{el} (h^{-1})	0,025	0,002
$T_{1/2}$ (horas)	27	243
ASC_{0-336} (pg*h/ml)	2555715	8089767
ASC_{inf} (pg*h/ml)	2655941	13647161

VOLUNTÁRIO 13



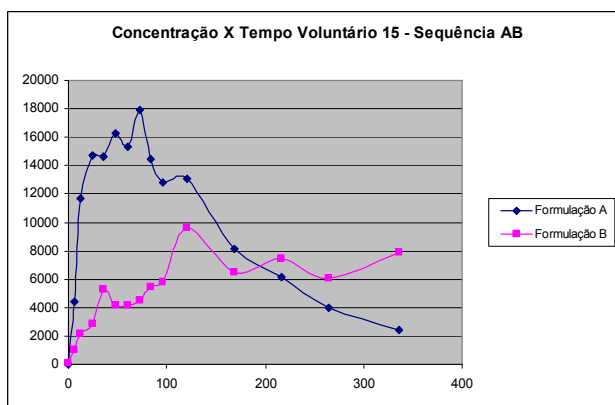
Parâmetro	Fármaco	
	Formulação A	Formulação B
T_{Max} (horas)	48	84
C_{Max} (pg/ml)	20788	18431
K_{el} (h^{-1})	0,003	0,014
$T_{1/2}$ (horas)	216	49
ASC_{0-336} (pg*h/ml)	4214504	2773240
ASC_{inf} (pg*h/ml)	6198445	3082362

VOLUNTÁRIO 14



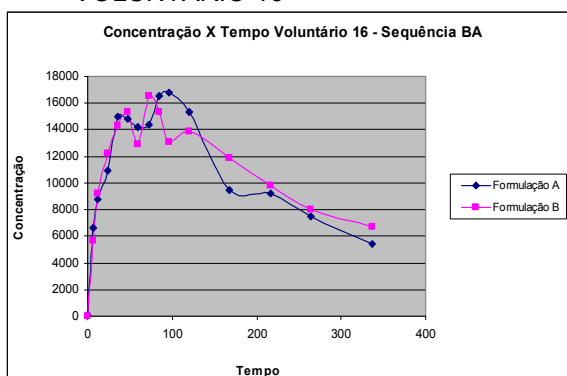
Parâmetro	Fármaco	
	Formulação A	Formulação B
T_{Max} (horas)	60	36
C_{Max} (pg/ml)	10077	7429
K_{el} (h^{-1})	0,002	0,023
$T_{1/2}$ (horas)	234	29
ASC_{0-336} (pg*h/ml)	1186903	870224
ASC_{inf} (pg*h/ml)	1341214	880475

VOLUNTÁRIO 15



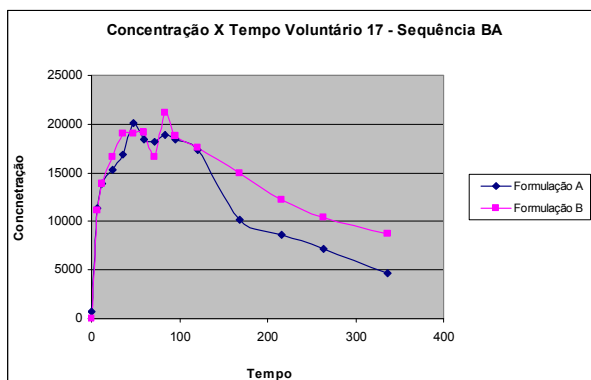
Parâmetro	Fármaco	
	Formulação A	Formulação B
T_{Max} (horas)	72	120
C_{Max} (pg/ml)	17902	9575
K_{el} (h^{-1})	0,007	0,002
$T_{1/2}$ (horas)	91	264
ASC_{0-336} (pg*h/ml)	2965173	2110628
ASC_{inf} (pg*h/ml)	3284566	5128071

VOLUNTÁRIO 16



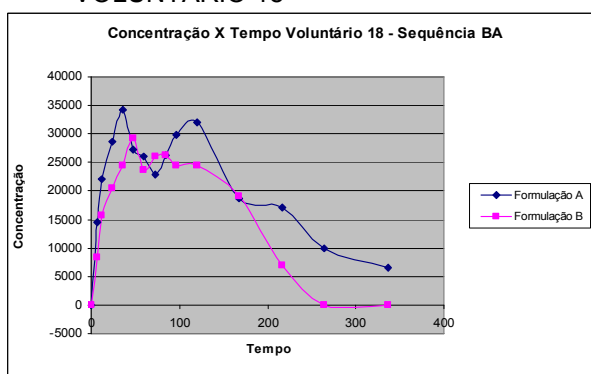
Parâmetro	Fármaco	
	Formulação A	Formulação B
T_{Max} (horas)	96	72
C_{Max} (pg/ml)	16763	16548
K_{el} (h^{-1})	0,004	0,003
$T_{1/2}$ (horas)	157	221
ASC_{0-336} (pg*h/ml)	3542242	3648731
ASC_{inf} (pg*h/ml)	4768196	5790025

VOLUNTÁRIO 17



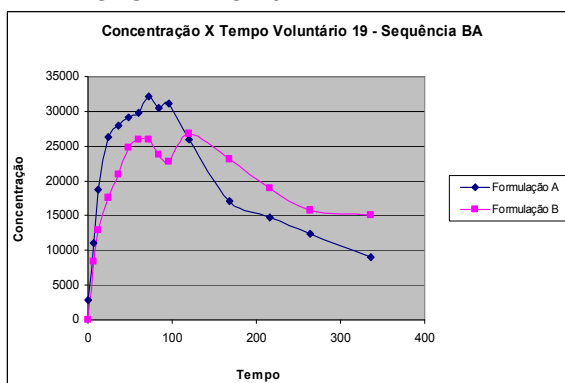
Parâmetro	Fármaco	
	Formulação A	Formulação B
T_{Max} (horas)	48	84
C_{Max} (pg/ml)	20136	254
K_{el} (h^{-1})	0,005	0,002
$T_{1/2}$ (horas)	135	254
ASC_{0-336} (pg*h/ml)	3947586	4743129
ASC_{inf} (pg*h/ml)	4868192	7963583

VOLUNTÁRIO 18



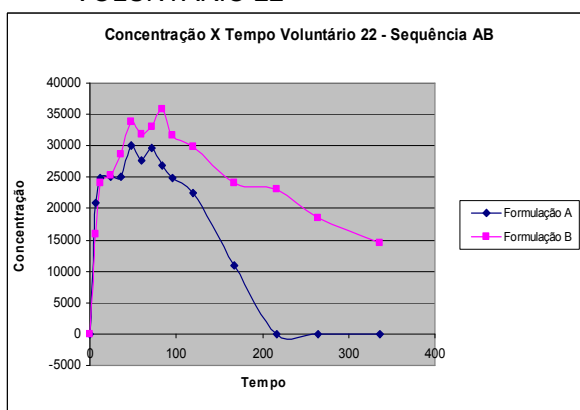
Parâmetro	Fármaco	
	Formulação A	Formulação B
T_{Max} (horas)	36	48
C_{Max} (pg/ml)	34264	52
K_{el} (h^{-1})	0,007	0,013
$T_{1/2}$ (horas)	88	52
ASC_{0-336} (pg*h/ml)	6517569	4553842
ASC_{inf} (pg*h/ml)	7358986	5073789

VOLUNTÁRIO 19



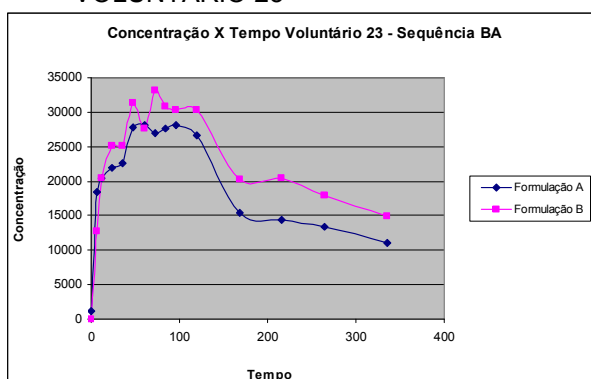
Parâmetro	Fármaco	
	Formulação A	Formulação B
T_{Max} (horas)	72	120
C_{Max} (pg/ml)	32196	380
K_{el} (h^{-1})	0,004	0,001
$T_{1/2}$ (horas)	170	380
ASC_{0-336} (pg*h/ml)	6447463	6713470
ASC_{inf} (pg*h/ml)	8671945	14972196

VOLUNTÁRIO 22



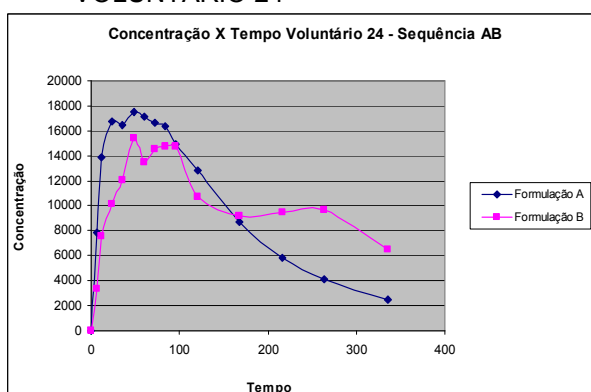
Parâmetro	Fármaco	
	Formulação A	Formulação B
T_{Max} (horas)	48	84
C_{Max} (pg/ml)	30066	180
K_{el} (h^{-1})	0,012	0,003
$T_{1/2}$ (horas)	57	180
ASC_{0-336} (pg*h/ml)	4093839	8108909
ASC_{inf} (pg*h/ml)	4994270	11875775

VOLUNTÁRIO 23



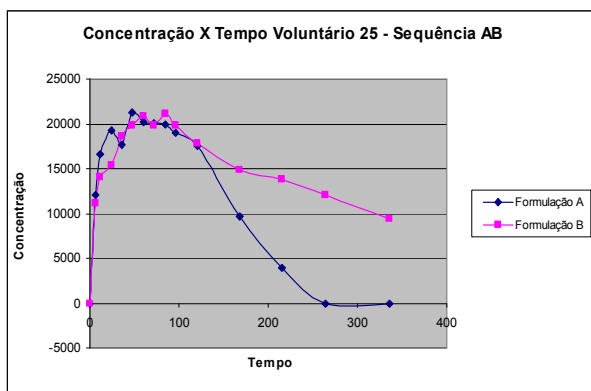
Parâmetro	Fármaco	
	Formulação A	Formulação B
T_{Max} (horas)	60	72
C_{Max} (pg/ml)	28113	260
K_{el} (h^{-1})	0,002	0,002
$T_{1/2}$ (horas)	311	260
ASC_{0-336} (pg*h/ml)	6261985	7543221
ASC_{inf} (pg*h/ml)	11264812	13118600

VOLUNTÁRIO 24



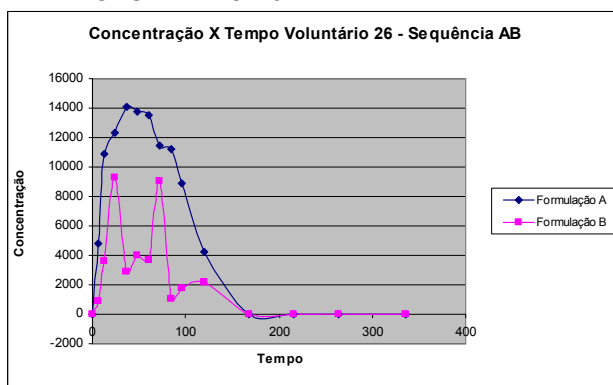
Parâmetro	Fármaco	
	Formulação A	Formulação B
T_{Max} (horas)	48	48
C_{Max} (pg/ml)	17489	205
K_{el} (h^{-1})	0,007	0,003
$T_{1/2}$ (horas)	97	205
ASC_{0-336} (pg*h/ml)	3150611	3414243
ASC_{inf} (pg*h/ml)	3500149	5332145

VOLUNTÁRIO 25



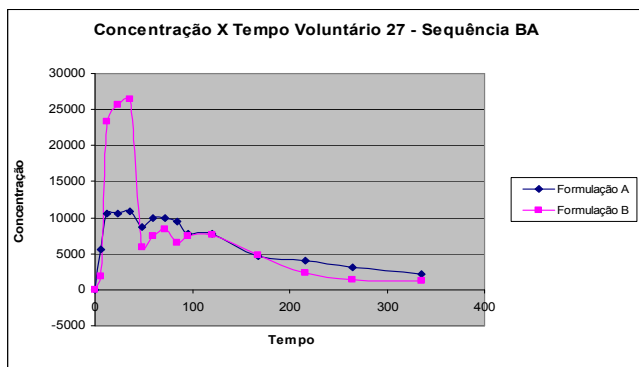
Parâmetro	Fármaco	
	Formulação A	Formulação B
T_{Max} (horas)	48	84
C_{Max} (pg/ml)	21313	215
K_{el} (h^{-1})	0,015	0,003
$T_{1/2}$ (horas)	43	215
ASC_{0-336} (pg*h/ml)	3268353	5023345
ASC_{inf} (pg*h/ml)	3514316	7960915

VOLUNTÁRIO 26



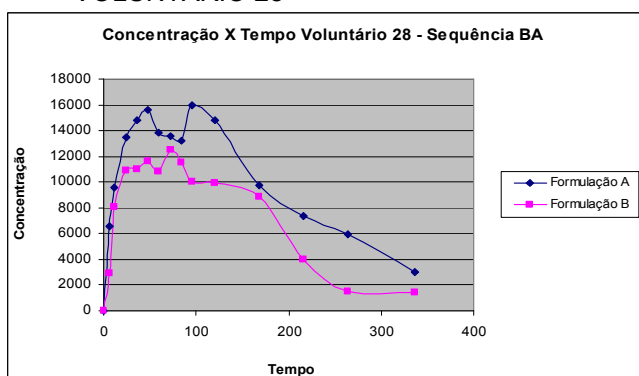
Parâmetro	Fármaco	
	Formulação A	Formulação B
T_{Max} (horas)	36	24
C_{Max} (pg/ml)	14116	36
K_{el} (h^{-1})	0,027	0,018
$T_{1/2}$ (horas)	25	36
ASC_{0-336} (pg*h/ml)	1358267	505253
ASC_{inf} (pg*h/ml)	1514335	617637

VOLUNTÁRIO 27



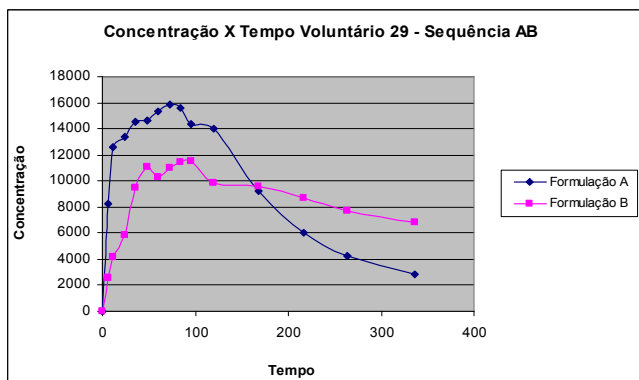
Parâmetro	Fármaco	
	Formulação A	Formulação B
T_{Max} (horas)	36	36
C_{Max} (pg/ml)	10943	124
K_{el} (h^{-1})	0,005	0,005
$T_{1/2}$ (horas)	134	124
ASC ₀₋₃₃₆ (pg*h/ml)	1941852	2055591
ASC _{inf} (pg*h/ml)	2365022	2266803

VOLUNTÁRIO 28



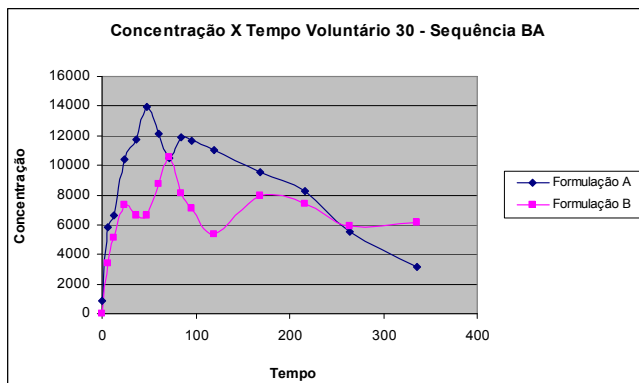
Parâmetro	Fármaco	
	Formulação A	Formulação B
T_{Max} (horas)	96	72
C_{Max} (pg/ml)	15977	87
K_{el} (h^{-1})	0,007	0,007
$T_{1/2}$ (horas)	90	87
ASC ₀₋₃₃₆ (pg*h/ml)	3245595	22059032
ASC _{inf} (pg*h/ml)	3637774	2387893

VOLUNTÁRIO 29



Parâmetro	Fármaco	
	Formulação A	Formulação B
T_{Max} (horas)	72	96
C_{Max} (pg/ml)	15836	343
K_{el} (h^{-1})	0,006	0,002
$T_{1/2}$ (horas)	113	343
ASC ₀₋₃₃₆ (pg*h/ml)	3080847	2906135
ASC _{inf} (pg*h/ml)	3547087	6272683

VOLUNTÁRIO 30



Parâmetro	Fármaco	
	Formulação A	Formulação B
T_{Max} (horas)	48	72
C_{Max} (pg/ml)	13972	528
K_{el} (h^{-1})	0,007	0,001
$T_{1/2}$ (horas)	86	528
ASC ₀₋₃₃₆ (pg*h/ml)	2855459	2774352
ASC _{inf} (pg*h/ml)	3253220	6987513

ANEXO B

Verificação do pressuposto de normalidade dos parâmetros farmacocinéticos

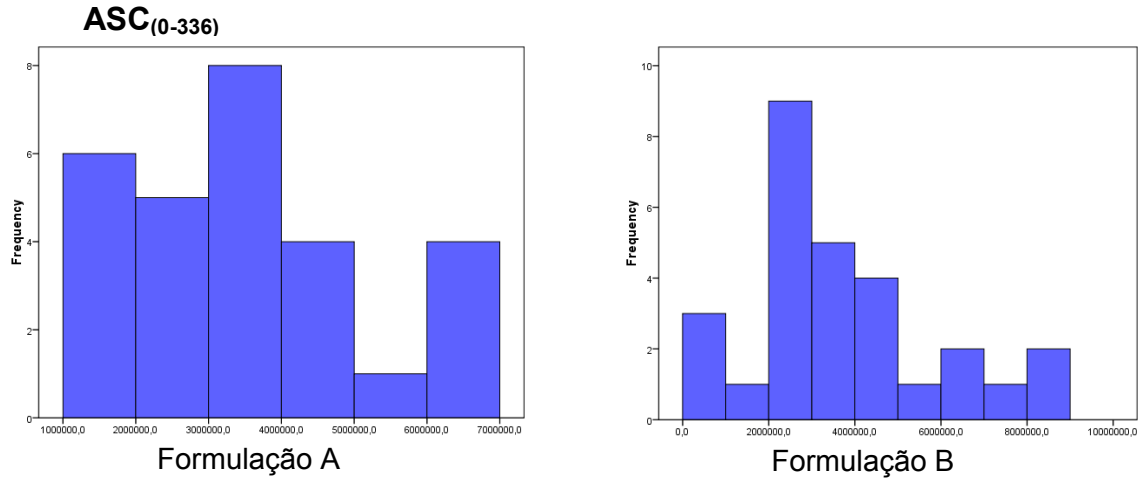


Figura 1: Gráfico de Histograma da $ASC_{(0-336)}$ (pg/h/ml) para as Formulações A e B

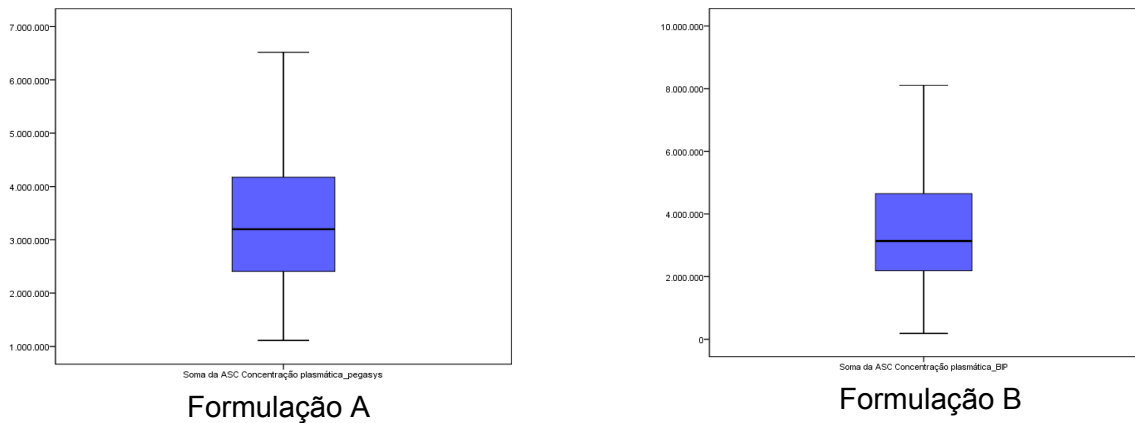


Figura 2: Gráfico Bloxplot da $ASC_{(0-336)}$ (pg/h/ml) para as Formulações A e B

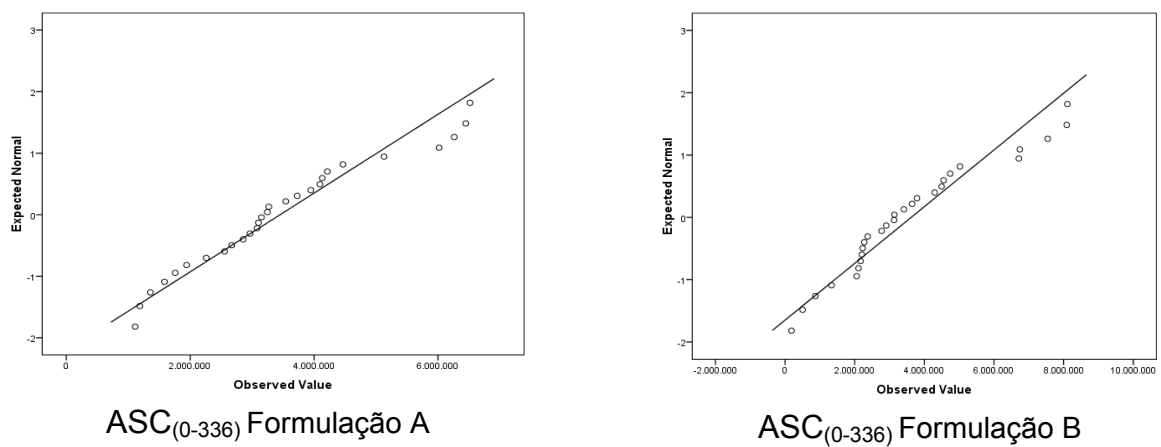


Figura 3: Gráfico normal de probabilidade da $ASC_{(0-336)}$ (pg/h/ml) para as Formulações A e B

ASC (0-inf)

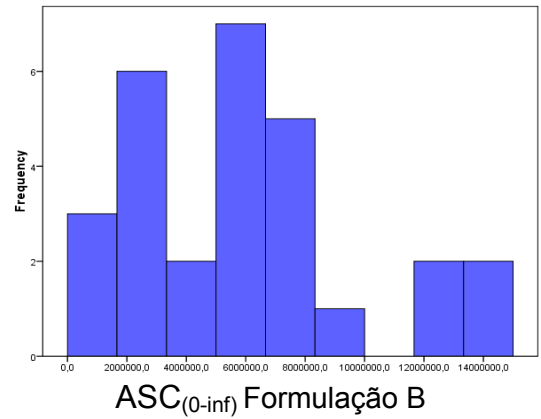
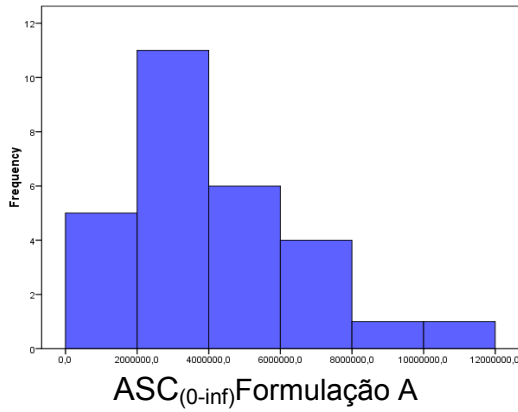


Figura 4: Gráfico de Histograma da ASC_(0-inf) (pg/h/ml) para as Formulções A e B

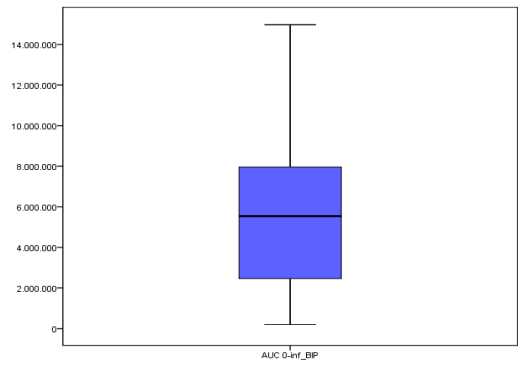
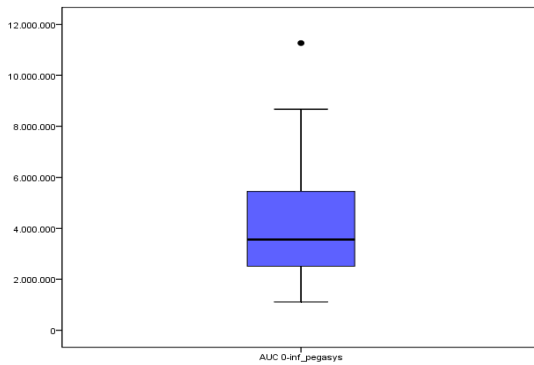


Figura 5: Gráfico Bloxplot da ASC_(0-inf) (pg/h/ml) para as Formulções A e B

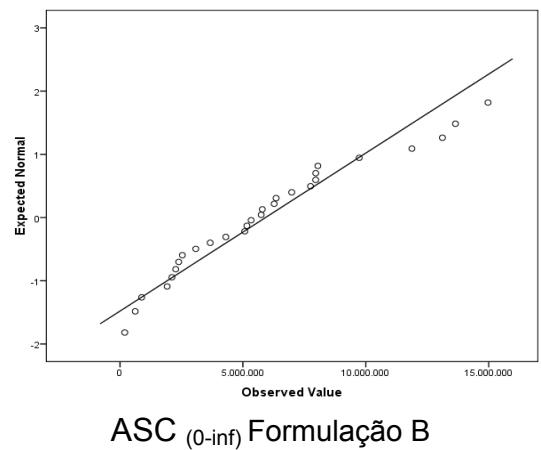
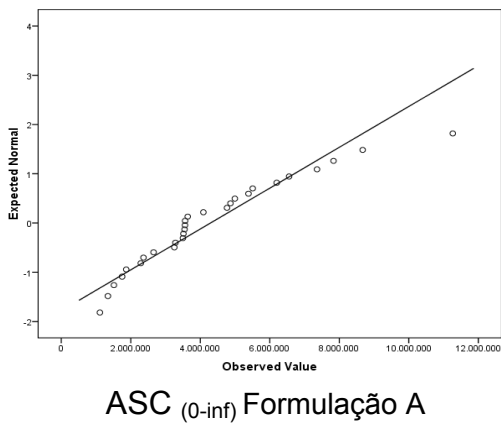


Figura 6: Gráfico normal de probabilidade da ASC_(0-inf) (pg/h/ml) para as Formulções A e B

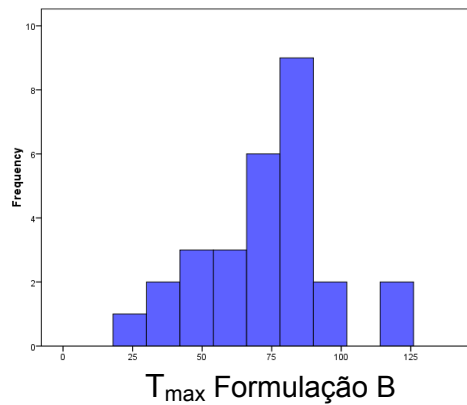
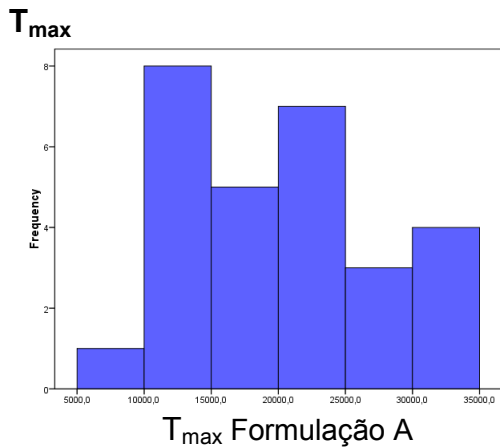


Figura 7: Gráfico de Histograma da T_{max} (horas) para as Formulacões A e B

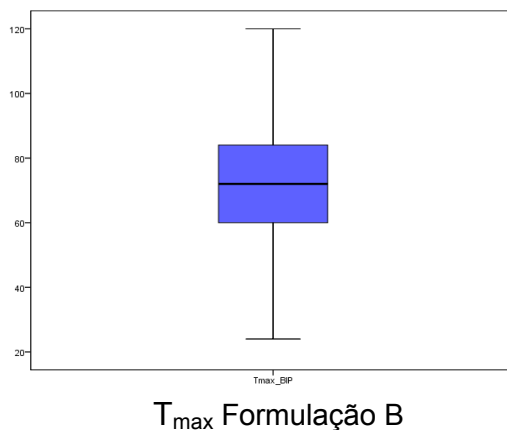
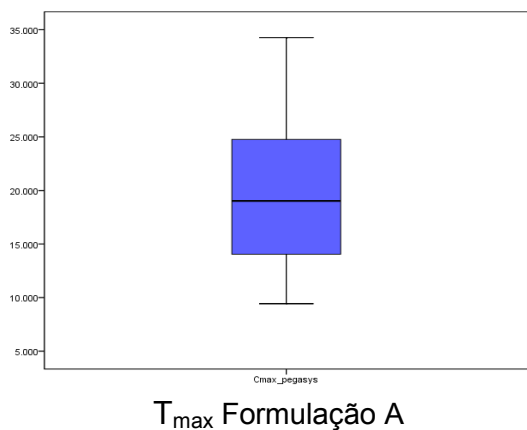


Figura 8: Gráfico Bloxplot da T_{max} (horas) para as Formulacões A e B

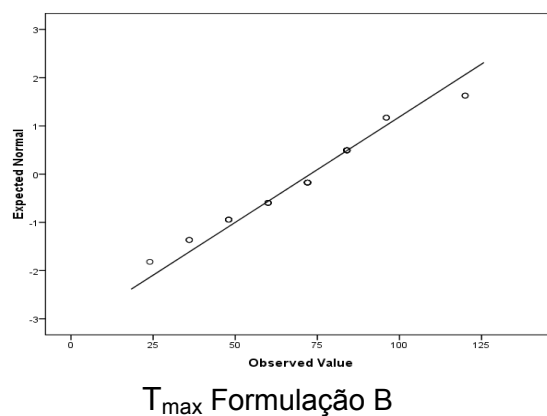
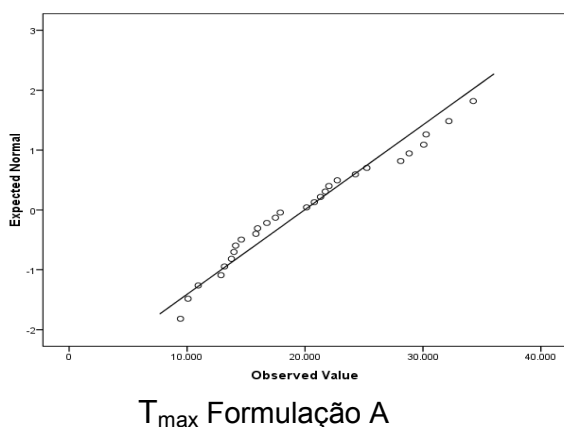


Figura 9 Gráfico normal de probabilidade da T_{max} (horas) para as Formulacões A e B

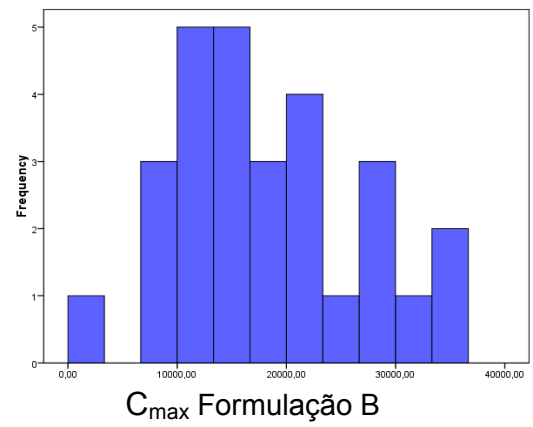
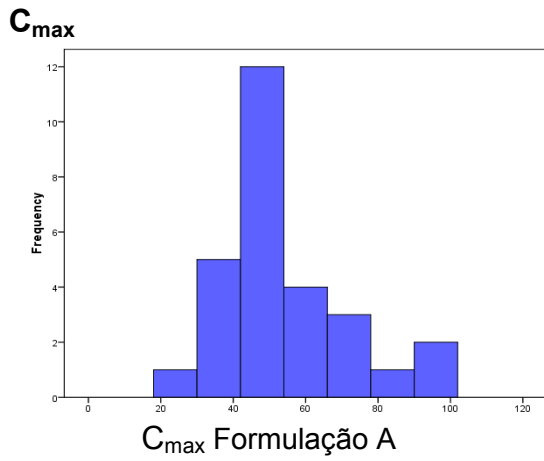


Figura 10: Gráfico de Histograma da C_{max} (pg/ml) para as Formulações A e B

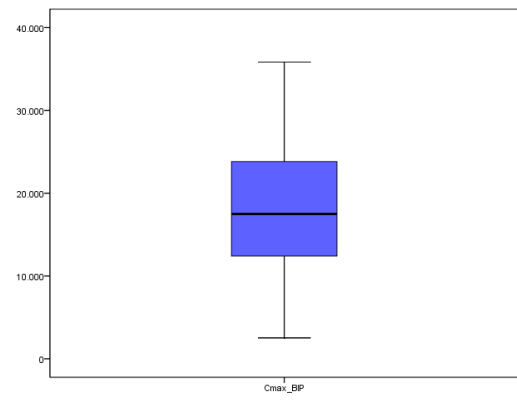
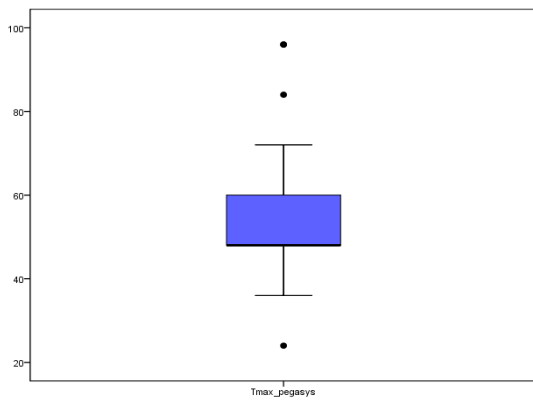


Figura 11: Gráfico Bloxplot da C_{max} (pg/ml) para as Formulações A e B

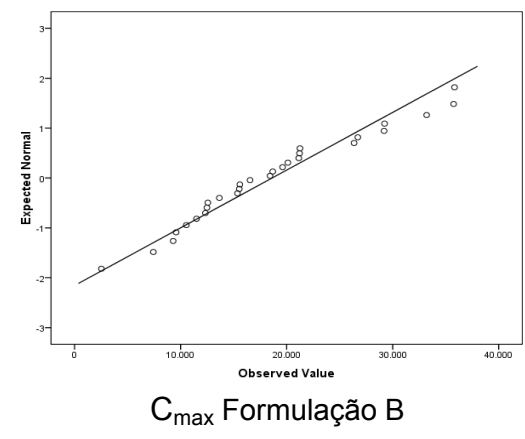
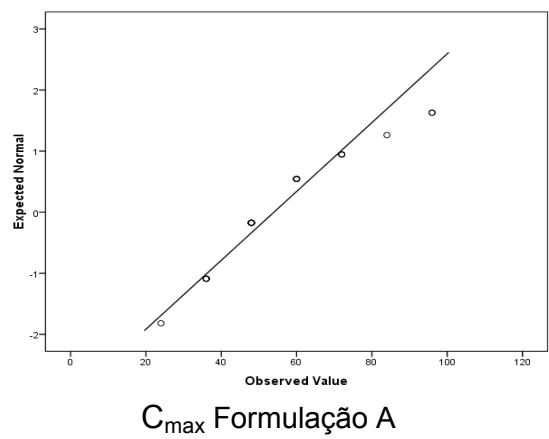


Figura 12: Gráfico normal de probabilidade da C_{max} (pg/ml) para as Formulações A e B

Para as variáveis C_{\max} e $ASC_{(0-336)}$, os Box plot da Formulação A e B não revelam diferenças em relação às medidas centrais como mediana, nem com relação à variabilidade, parecendo haver simetria em cada um dos fármacos. Observa-se ainda a ausência de valores discrepantes (*outliers*) nas observações destas variáveis. Para as variáveis T_{\max} e $ASC_{(0-inf)}$ para a Formulação B verifica-se simetria. Estas duas variáveis apresentam indicativos de assimetria e valores discrepantes, quando analisadas para a Formulação A.

ANEXO C

Análise preliminar dos efeitos residuais

Tabela 1: Médias de T_{max} das Formulações A e B nos períodos 1 e 2

Sequência	Período 1	Período 2	Média
AB	51,69	72,00	61,85
BA	73,60	56,00	64,80
Média	62,65	64,00	63,32

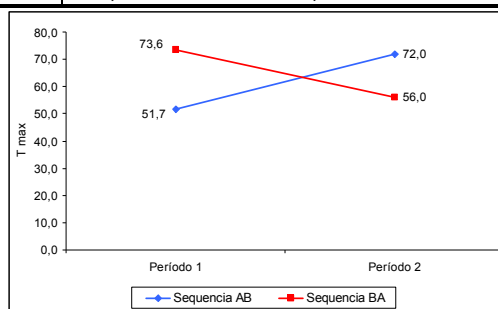


Figura 1: Médias de T_{max} das Formulações A e B nos períodos 1 e 2

As diferenças entre médias dos dois fármacos em cada período são semelhantes. Verifica-se que nos dois períodos a formulação A apresentou T_{max} médio inferior à formulação B. A avaliação preliminar dos efeitos residuais, resultou em $p=0,655$ para o teste t de amostras independentes, indicando a não existência de efeitos residuais.

Tabela 2: Médias de C_{max} das Formulações A e B nos períodos 1 e 2

Sequência	Período 1	Período 2	Média
AB	18032,33	16638,44	17335,38
BA	20357,81	21631,71	20994,76
Média	19195,07	19135,07	19165,07

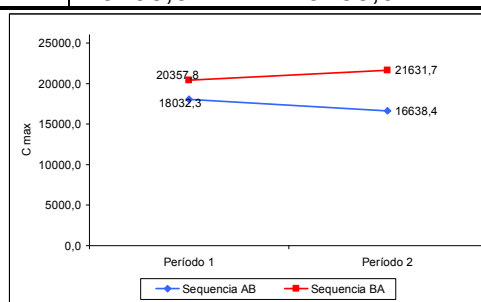


Figura 2: Médias de C_{max} das Formulações A e B nas sequências 1 e 2

As diferenças entre médias dos dois fármacos em cada período são semelhantes. Verifica-se que no período 1 a formulação A apresentou C_{max} médio inferior à formulação B, enquanto que no segundo período esta situação se inverteu. A avaliação preliminar dos efeitos residuais resultou em $p=0,180$ para o teste t de amostras independentes, indicando a não existência de efeitos residuais.

Tabela 3: Médias de $ASC_{(0-336)}$ das Formulações A e B nas sequências 1 e 2

Sequência	Período 1	Período 2	Média
AB	2642034,14	3310962,31	2976498,23
BA	3892089,80	4149774,71	4020932,25
Média	3267061,97	3730368,51	3498715,24

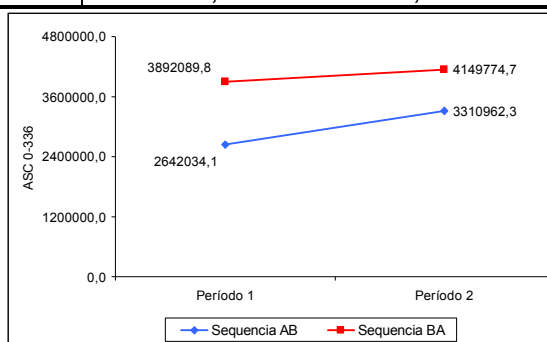


Figura 3: Médias de $ASC_{(0-336)}$ das Formulações A e B nas sequências 1 e 2

A avaliação preliminar dos efeitos residuais resultou em $p=0,112$ para o teste t de amostras independentes, indicando a não existência de efeitos residuais.

Tabela 4: Médias de $ASC_{(0-inf)}$ das Formulações A e B nas sequências 1 e 2

Sequência	Período 1	Período 2	Média
AB	4905560,63	5599638,62	5252599,63
BA	6398182,53	5403427,71	5900805,12
Média	5651871,58	5501533,16	5576702,37

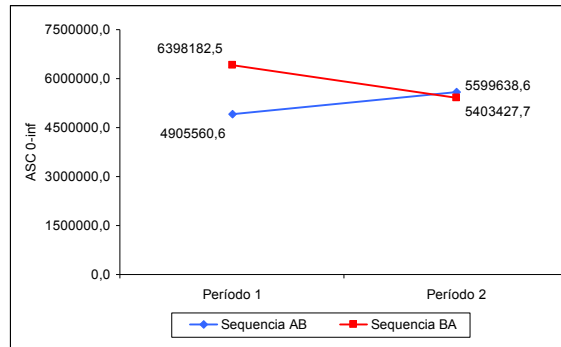


Figura 4: Médias de $ASC_{(0-inf)}$ das Formulações A e B nas sequências 1 e 2

2

A avaliação preliminar dos efeitos residuais resultou em $p=0,984$ para o teste t de amostras independentes, indicando a não existência de efeitos residuais.

Tabela 5: Médias de $T_{1/2}$ das Formulações A e B nas sequências 1 e 2

Sequência	Período 1	Período 2	Média
AB	234,52	211,93	223,23
BA	201,68	142,91	172,30
Média	218,10	177,42	197,76

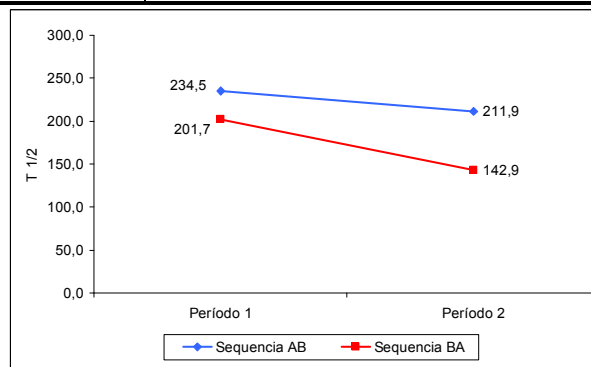


Figura 5: Médias de $T_{1/2}$ das Formulações A e B nas sequências 1 e 2

As diferenças entre médias dos dois fármacos em cada período são semelhantes. Verifica-se que nos dois períodos as formulações apresentaram $T_{1/2}$ médio semelhantes. A avaliação preliminar dos efeitos residuais resultou em $p=0,529$ para o teste t de amostras independentes, indicando a não existência de efeitos residuais.