



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

MARIANA MACHADO MATOS

Estudo de biodisponibilidade comparativa da Capecitabina em participantes sadios do
sexo masculino após alimentação

Campinas
2018

MARIANA MACHADO MATOS

Estudo de biodisponibilidade comparativa da Capecitabina em participantes sadios do sexo masculino após alimentação

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Farmacologia, sob orientação do Prof. Dr. Gilberto de Nucci.

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Mariana Machado Matos, e orientada pelo Prof. Dr. Gilberto de Nucci.

CAMPINAS
2018

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

M428e Matos, Mariana Machado, 1980-
Estudo de biodisponibilidade comparativa da Capecitabina em participantes sadios do sexo masculino após alimentação / Mariana Machado Matos. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Gilberto de Nucci.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Capecitabina. 2. Farmacocinética. 3. Cromatografia. 4. Espectrometria de massas. 5. Fluoruracila. 6. Neoplasias da mama. 7. Neoplasias colorretais. I. De Nucci, Gilberto, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Comparative bioavailability study of Capecitabine in healthy male subjects under fed conditions

Palavras-chave em inglês:

Capecitabine

Pharmacokinetics

Chromatography

Mass spectrometry

Fluorouracil

Breast neoplasms

Colorectal neoplasms

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Mestra em Farmacologia

Banca examinadora:

Gilberto de Nucci [Orientador]

Cesário Bianchi Filho

Julia Shinzato

Data de defesa: 14-09-2018

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

MARIANA MACHADO MATOS

ORIENTADOR: Prof. Dr. Gilberto de Nucci

MEMBROS:

- 1. PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI**
 - 2. PROF. DRA. JULIA YORIKO SHINZATO**
 - 3. PROF. DR. CESARIO BIANCHI FILHO**
-

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica da aluna.

Data: 14/09/2018

Dedico esse trabalho a todas as pessoas, em especial às mulheres assim como eu, que acreditam em seu potencial e se dedicam à ciência, buscando sempre novos desafios.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Gilberto de Nucci por essa oportunidade de aprendizado;

Ao Prof. Dr. Ronilson Moreno, pela dedicação, orientação e ensino;

Aos meus pais, que sempre foram minha fonte de inspiração e exemplo;

E aos meus irmãos pelo amor e admiração.

RESUMO

O câncer é um grande desafio de saúde pública, gerando enormes custos e a sua prevalência tende a aumentar. A capecitabina é uma pró-droga de quimioterapia por via oral indicada no tratamento de câncer de mama e gastrointestinal. O objetivo deste estudo foi avaliar comparativamente a biodisponibilidade da capecitabina (um produto teste e o referência) a fim de determinar a bioequivalência para registro de um medicamento genérico, com menor custo para a população. Foi realizado um estudo de fase IV, monocêntrico, randomizado, aberto, cruzado, semi-replicado, em participantes sadios com 2 administrações em dose única de 150mg, em 3 períodos: formulação teste (1 ocasião) ou a formulação referência (em 2 ocasiões), após alimentação padronizada. Foi utilizada Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS-MS) para o método analítico, obtendo-se a razão geométrica de C_{max} entre tratamentos de 104,0766 com I.C. 90% (88,1322; 122,9057), de ASC_{0-t} 104,3403 e I.C. 90% (98,7468; 110,2506) e ASC_{0-inf} 103,0665 e I.C. 90% (97,4852; 108,967). Os medicamentos se mostraram seguros e bem tolerados. Em conclusão, visto que o intervalo de confiança de 90% para a razão geométrica está dentro do intervalo definidos pelas autoridades regulatórias (80-125%), os produtos são bioequivalentes.

Palavras-chave: capecitabina, farmacocinética, cromatografia, espectrometria de massa, fluorouracila, neoplasias da mama, neoplasias coloretais.

ABSTRACT

Cancer is a major public health challenge, generating huge costs and its prevalence tends to increase. Capecitabine is an oral pro-drug chemotherapy indicated in the treatment of breast and gastrointestinal cancer. The objective of this study was to evaluate comparatively the bioavailability of capecitabine (a test product versus its reference), in order to determine the bioequivalence for registration of a generic drug, with lower cost for the population. A phase IV, monocentric, open-label, cross-over study in healthy subjects with 2 administrations in a single dose of 150mg, during 3 periods: test formulation (1 occasion) or the reference formulation (2 occasions) was performed under standardized fed conditions. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS-MS) was used for the analytical method, obtaining a geometric ratio of C_{max} among the treatments of 104.0766 with 90% CI (88.11322; 122.9057), AUC_{0-last} 104.3403 and 90% CI (98.7468; 110.2506) and AUC_{0-inf} 103.0665 and 90% CI (97.4852, 108.967). Medications were safe and well tolerated. In conclusion, since the 90% confidence interval for the geometric ratio is within the regulatory authorities accepted range (80-125%), the products are bioequivalent.

Key-words: Capecitabine, pharmacokinetics, chromatography, mass spectrometry, fluorouracil, breast neoplasms, colorectal neoplasms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. História da quimioterapia.....	18
Figura 2. Classificação de agentes quimioterápicos de acordo com sua ação no DNA, na transcrição e tradução.....	19
Figura 3. Fórmula estrutural da capecitabina.....	20
Figura 4. Metabolismo da capecitabina.....	22
Figura 5. Anabolismo e catabolismo do 5-FU.....	23
Figura 6. Acomentimento de mãos na Síndrome mão-pé devido uso de capecitabina.....	25
Figura 7. Curva de concentração plasmática pelo tempo de coleta.....	33
Quadro 1. Exames laboratoriais vinculados ao processo de seleção.....	37
Figura 8. Análise de plasma dos participantes antes da administração do medicamento.....	46
Figura 9. Análise cromatográfica da Capecitabina, produzindo pico, sendo identificada no limite inferior de detecção.....	46
Figura 10. Análise cromatográfica da Capecitabina, produzindo pico, sendo identificada no limite superior de detecção.....	47
Quadro 2. Descrição dos equipamento de LC-MS/MS.....	47
Quadro 3. Descrição dos solventes e reagentes.....	48
Quadro 4. Descrição dos materiais e instrumentos de analítica.....	48
Quadro 5. Descrição dos padrões de referência : analito e padrão interno.....	48
Quadro 6. Condições cromatográficas e de extração.....	51
Quadro 7. Sumário do método bioanalítico.....	53
Figura 11. Fluxograma de participantes.....	58
Figura 12. Concentração plasmática média por analito e tratamento.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Observação dos efeitos adversos da capecitabina quanto a frequência e duração em pacientes.....	26
Tabela 2. Preparação da solução primária do analito para as curvas de calibração e controles de qualidade.....	50
Tabela 3. Preparação da solução primária do padrão interno.....	50
Tabela 4. Descrição das condições de detecção.....	51
Tabela 5. Descrição dos parâmetros farmacocinéticos avaliados após administração da capecitabina, produto teste e referência.....	58
Tabela 6. Resultados estatísticos por parâmetro farmacocinéticos.....	59
Tabela 7. Distribuição dos resultados finais apurados: biodisponibilidade comparativa média.....	60
Tabela 8. Resultados avaliação inter, intra sujeito e variáveis.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ALT	Aminotransferase de alanine
ASC	Área sob a curva
ASC _{0-t}	Área Sob a Curva do instante inicial até o último tempo quantificável
ASC _{0-inf}	Área Sob a Curva do instante inicial até o tempo relativo à completa eliminação do fármaco.
AST	Aminotransferase de aspartate
CDA	Citidina desaminase
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
C _{max}	Concentração máxima plasmática
CONEP	Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
CRF	Çaderno de registro de dados
C _t	Última concentração quantificada
CVWR	Coeficiente de variação
5'-DFCR	5'-desoxi-5-fluorocittidina
5'-DFUR	5'-desoxi-5-fluorouridina
DPD	Dihidropirimidina desidrogenase
DNA/ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ECG	Eletrocardiograma
EMA	Agência Européia de Medicamento
ESI	Ionização por Electrospray
FDA	Food and Drug Administration
F-dUMP	Monofosfato de fluorodesoxiuridina
FdUTP	Trifosfato de fluorodesoxiuridina
5-FU	5-fluouracil
FUTP	Fluorouridina-5-trifosfato
GGT	gama glutamil transpeptidase
HPLC-ESI-MS/MS	Cromatografia Líquida de Alta Performance pareada com Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
HPV	Papilomavírus humano
IMC	Índice de Massa Corpórea
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Ke	Constante de velocidade de eliminação terminal de primeira ordem
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite inferior de quantificação
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas
MS	Espectrometria de Massas
MS/MS	Espectrometria de Massas em Tandem
PI	Padrão interno
OMS	Organização Mundial de Saúde
SIM	Sistema de Informação de Mortalidade do Ministério da Saúde.
SUS	Sistema Único de Saúde
t _{1/2}	Meia vida de eliminação do fármaco

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Tmax	Tempo para atingir a concentração máxima
TP	Timidina fosforilase
TS	Timidilato sintase
RRT	Referência- referência -teste
RTR	Referência- teste-referência
RNA/ ARN	Ácido ribonucleico
TRR	Teste- referência- referência

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Oncologia atual.....	16
1.2 Epidemiologia.....	16
1.3 Terapêutica.....	18
1.4 Capecitabina.....	20
1.4.1 Indicações	21
1.4.2 Farmacocinética	22
1.4.3 Farmacodinâmica	25
1.4.4 Contraindicações e Precauções no uso	25
1.4.5 Efeitos adversos	26
1.4.6 Interações farmacológicas.....	28
1.4.7 Posologia.....	28
1.5 Estudos de Bioequivalência.....	29
1.5.1 Histórico.....	29
1.5.2. Conceitos.....	30
1.5.3 Estrutura dos estudos de bioequivalência	31
1.6 Justificativa do estudo	34
2 OBJETIVOS	36
3. METODOLOGIA.....	37
3.1 Desenho do estudo	37
3.2 Ética em Pesquisa.....	37
3.3 Etapa Clínica	37
3.3.1 População de Estudo	37

3.3.2 Critérios de inclusão e exclusão	38
3.3.3 Formulações sob investigação	40
3.3.4 Internação dos participantes.....	41
3.3.5 Dieta	41
3.3.6 Restrições.....	42
3.3.6.1 Medicamentos	42
3.3.6.2 Outras Restrições quanto a Terapias e Condutas.....	43
3.3.7 Segurança	43
3.3.8 Critérios de retirada	43
3.3.9 Coleta de amostras	44
3.3.10 Processamento, armazenamento e transporte das amostras	45
3.4 Etapa Analítica	46
3.4.1 Descrição dos reagentes, instrumentos, equipamentos e padrões	48
3.4.2 Recebimento e armazenamento das amostras	50
3.4.3 Cálculo de concentração das amostras.....	50
3.4.4 Calibração, soluções padrão e controle de qualidade de amostras	50
3.4.4.1 Padrões de calibração e controles de qualidade	50
3.4.4.2 Preparação das soluções primárias	51
3.4.5 Condições cromatográficas	52
3.4.6 Validação do método bioanalítico	52
3.5 Etapa Estatística.....	55
4 RESULTADOS	58
4.1 Análise descritiva.....	58
4.2 Análise farmacocinética.....	59
4.3 Análise tolerância e segurança.....	61

5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÃO.....	67
7 REFERÊNCIAS.....	68
8 ANEXOS.....	74

1. INTRODUÇÃO

1.1 Oncologia atual

O câncer é um problema atual de saúde pública. De fato é uma das principais causas de morte no mundo todo, ocupando o segundo lugar na maioria dos países e a perspectiva é de aumento da incidência em vista do crescimento e do envelhecimento da população, podendo ultrapassar as doenças cardiovasculares [1].

A etiologia é multifatorial. Desde fatores genéticos a ambientais. Hábitos da vida moderna favorecem a ocorrência do câncer. O sedentarismo associado ao alto índice de massa corporal, a baixa ingestão de frutas e de vegetais, o uso de tabaco e álcool; além de infecções como hepatite e HPV estão diretamente relacionados à ocorrência do câncer [2,3].

Além disso, o impacto econômico do câncer é preocupante e está aumentando. O custo anual total do câncer em 2010 foi estimado em aproximadamente US\$ 1,16 trilhão [3]. Países em desenvolvimento como o Brasil enfrentam enormes desafios no acesso a saúde de um modo geral. Falta de recursos é a principal delas. A complexidade do tratamento do câncer exige a busca pelo acesso a um menor custo para poder atender a população.

Cabe ressaltar que, de acordo com Medici (2018), os gastos brasileiros com tratamento do câncer vem aumentando. De 1999 a 2015 houve um aumento de sete vezes: de R\$470 milhões para R\$3,3 bilhões sendo a quimioterapia responsável por dois terços desses gastos [4].

1.2 Epidemiologia

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, com aproximadamente 14

milhões de novos casos em 2012 [5]. Espera-se que este número aumente cerca de 70% nas próximas duas décadas.

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo. Em 2015 foi responsável por 8,8 milhões de mortes, sendo os mais frequentes com alto índice de mortalidade o câncer de pulmão com 1,69 milhões de mortes, seguido de fígado com 788 mil mortes, colorretal com 774 mil mortes, estômago com 754 mil mortes e mama com 571 mil mortes. Globalmente, quase 1 em 6 mortes são causadas por câncer, sendo que aproximadamente 70% das mortes por câncer ocorrem em países de baixa e média renda [3].

Cânceres de pulmão e mama são os mais frequentemente diagnosticados no mundo e as principais causas de morte por câncer em homens e mulheres, respectivamente. Outros cânceres com alta incidência incluem hepático, gástrico e colorretal entre os homens e gástrico, colo uterino e colorretal entre as mulheres [2].

Em países desenvolvidos nota-se incidência importante do câncer de próstata, do câncer colorretal, do câncer de mama e de pulmão. Em se tratando de países em desenvolvimento, o câncer de fígado, gástrico e cervical apresentam incidência maior, tendo em vista sua etiologia infecciosa [2].

No Brasil, o câncer é a segunda causa de mortalidade. Em 10% dos municípios já é a primeira causa de mortalidade segundo dados do Sistema de Informação de Mortalidade (SIM) do Ministério da Saúde. Foi a terceira causa de internação no período de 2002 a 2012 de acordo com dados Sistema Único de Saúde (SUS) [1], e aproximadamente 200 mil brasileiros morreram por câncer em 2014 [4].

Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) de 2018 relatam uma estimativa de 600 mil novos casos de câncer no Brasil por ano, com 420 mil casos novos de câncer excluindo cânceres de pele não melanoma. Câncer de próstata e mama são os mais frequentes, com 68 mil e 60 mil novos casos, respectivamente. Há uma diferença de incidência de acordo com o sexo: nos homens “próstata (31,7%), pulmão (8,7%), intestino (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (29,5%), intestino (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%) e tireóide (4,0%)...” [6].

O câncer colorretal é o terceiro câncer mais comumente diagnosticado e a quarta causa de morte por câncer em todo o mundo [7]. Foram mais de um milhão de casos novos e quase 700 mil mortes no mundo em 2012 [2].

Sabe-se que o câncer gástrico é o quinto tipo de câncer mais frequente do mundo com 952 mil novos casos (7% da incidência total de câncer) e 723 mil mortes (9% da mortalidade total por câncer) em 2012 [5].

Adicionalmente, o câncer de mama é a principal causa de morte por câncer em mulheres em todo o mundo. Foram cerca de 1,7 milhão de casos e 521,9 mil mortes em 2012. O câncer de mama sozinho representa 25% de todos casos de câncer [2].

1.3 Terapêutica

Atualmente, os tratamentos de câncer incluem: procedimentos cirúrgicos, radioterapia e quimioterapia [8].

A história da quimioterapia começa com Paul Ehrlich, um químico dos anos 1900, que foi o primeiro a usar essa denominação para descrever agentes no tratamento da sífilis. A grande inovação foi o uso de modelos animais para comprovar eficácia. Ele também investiu em estudos contra o câncer sem muito sucesso. Foi realmente a partir de 1930 um empenho maior na busca de substâncias contra o câncer. O nascimento da quimioterapia ocorre após 1940, baseado em experiências durante a primeira guerra mundial e após a segunda guerra mundial através do uso da mostarda nitrogenada para tratamento de linfoma não-Hodgkin. O metotrexato foi desenvolvido em 1955 e, a partir desse evento, deram-se início às grandes pesquisas em câncer e antineoplásicos. E então, a partir de 1957, o 5-fluouracil (5-FU) começou a ser empregado conforme ilustrado na figura1, como fruto do trabalho de Charles Heidelberger, pesquisador norte americano (Figura 1) [9].

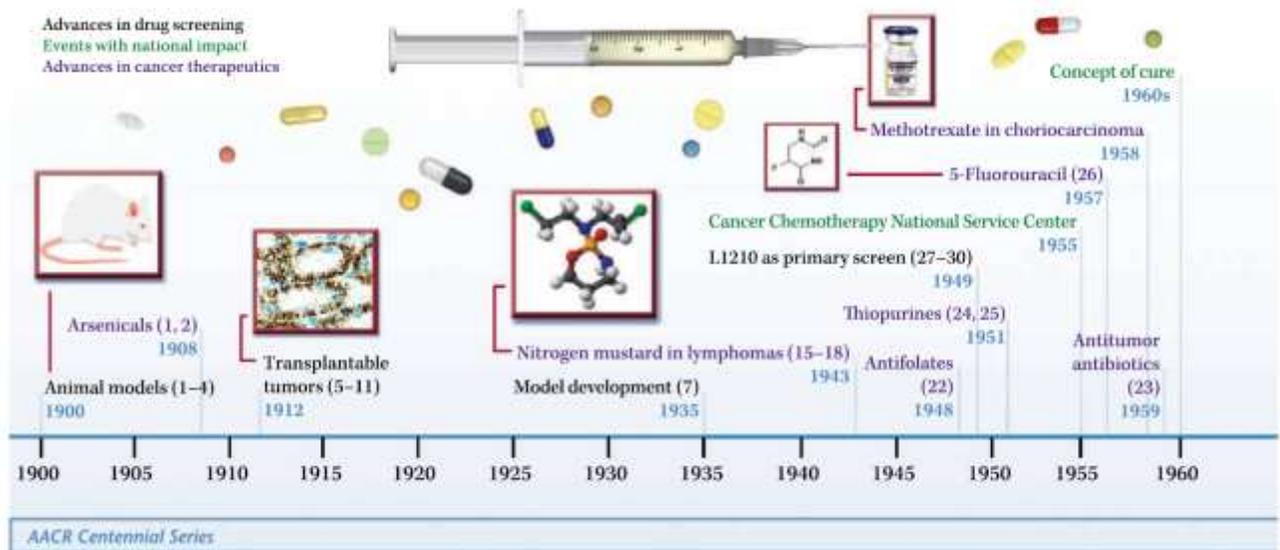


Figura 1. História da quimioterapia. Fonte: DeVita, 2008 [9].

O objetivo da quimioterapia é atingir células neoplásicas provocando sua destruição. Os agentes antineoplásicos possuem afinidade para células apresentando crescimento rápido, o que é característico de células cancerígenas mas também de células normais do folículo piloso, gastrointestinais e sistema hematopoiético, justificando assim os principais efeitos colaterais dessa terapêutica [8]. A quimioterapia pode ser classificada de acordo com sua ação no DNA (Figura 2) [8]. Os mais utilizados são: alquilantes polifuncionais, antimetabólitos, antibióticos antitumorais, inibidores mitóticos e outros [10]. Alquilantes polifuncionais inibem a replicação do DNA, ligando-se a fita e impedindo sua separação. São eles: ciclofosfamida, cisplatina, bussulfam, nitrosuréias e mostarda nitrogenada [10]. Os antimetabólitos são capazes de impedir a biosíntese de elementos essenciais para a formação de DNA e RNA, agindo principalmente fase de síntese do ciclo celular (fase S), impossibilitando que haja mitose. São eles: 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, 5-FU, metotrexato e citosina-arabinosídeo C [10]. Os antibióticos antitumorais inibem DNA de diversos mecanismos de acordo com suas propriedades, e, assim produzem radicais livres reativos, sendo a bleomicina o antibiótico antitumoral mais conhecido [10]. Por fim os inibidores mitóticos agem diretamente na tubulina impedindo a mitose, e são comumente utilizados em associação. São eles: vincristina, vimblastina e vindesina e derivados da podofilotoxina (o VP-16, etoposídeo; e o VM-26, teniposídeo) [10].

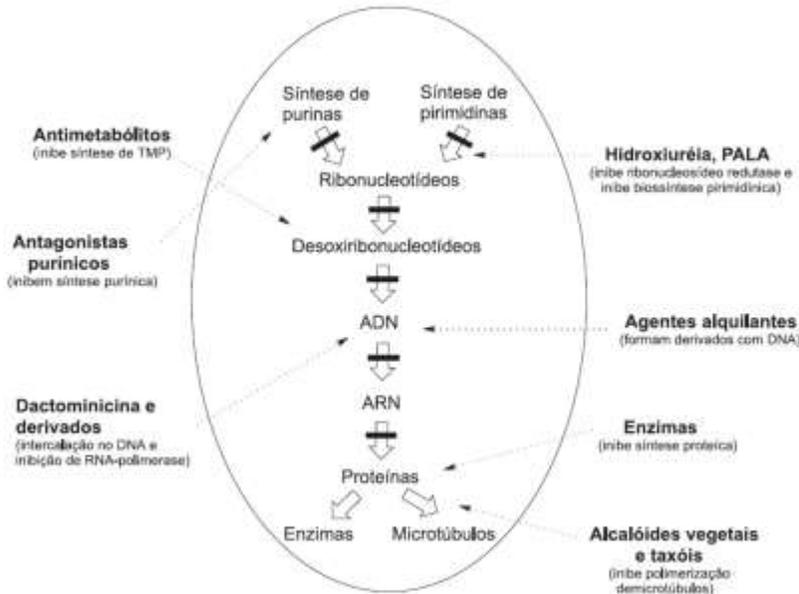


Figura 2. Classificação de agentes quimioterápicos de acordo com sua ação no DNA, na transcrição e tradução. Fonte: Almeida *et al.* (2005) [8].

Cada vez mais as pesquisas no ramo da oncologia avançam na busca de terapêutica mais eficaz ou pelo menos mais específica, com menor toxicidade. A tolerabilidade de drogas quimioterápicos é importante na escolha terapêutica e tem um peso a mais quando se trata de tratamento paliativo [11]. Ainda assim algumas drogas utilizadas há décadas continuam sendo empregadas. É o caso do 5-FU [12].

1.4 Capecitabina

A capecitabina é um agente quimioterápico citotóxico, antimetabólito, aprovado para uso desde 1998. É uma pró-droga pertencente ao grupo das fluoropirimidinas e amplamente utilizados no tratamento do câncer e de fórmula estrutural representada pela figura a seguir [13].

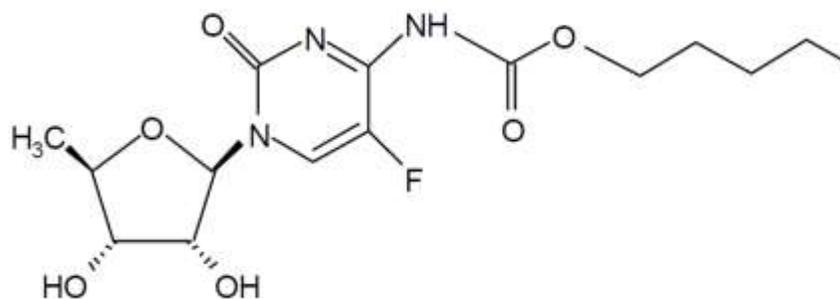


Figura 3. Fórmula estrutural capecitabina. Características Físico-químicas: Nome químico: 5'-desoxi-5-fluoro-N - [(pentiloxi) carbonil] –citidina, peso molecular: 359,35. Fonte: FDA (2001) [14].

A capecitabina foi especificamente desenvolvida para disponibilizar 5-FU em células tumorais, sendo amplamente utilizada no manejo dos cânceres colorretal e de mama [15]. Por ser uma medicação de administração oral, sua vantagem em relação ao 5-FU é a facilidade de administração, uma vez que o 5-FU é injetável, apresentando meia vida curta, além da necessidade de acesso venoso central, gerando maior desconforto para o paciente e risco de complicações como infecção. Além disso, sua eficácia é comparável ao 5-FU intravenoso com um melhor perfil de segurança sendo observada menor incidência de estomatite, alopecia, diarreia, náuseas e neutropenia [11].

1.4.1 Indicações

Capecitabina é indicada em estágios avançados ou metastáticos de cânceres gastrointestinais ou de mama, sozinha e em combinação com outras drogas. No câncer colorretal é utilizada em monoterapia no tratamento adjuvante de pacientes com câncer colorretal Dukes' C (estágio III), submetidos à ressecção completa do tumor primário ou no tratamento de primeira linha de pacientes com carcinoma colorretal metastático. A capecitabina é utilizada em monoterapia no câncer colorretal metastático em torno de 17% dos casos, geralmente em pacientes que não tolerariam uma terapia mais agressiva [11]. É considerada tratamento de primeira linha para o câncer esofagogástrico avançado em combinação com um regime à base de platina [16, 17]. Já no câncer de mama, sua indicação é nos casos metastático ou localmente avançado, em combinação com docetaxel após falha no uso antraciclina ou em monoterapia após falha de taxane e como adjuvante com antraciclina ou taxane [17-19]. Sabe-se ainda que a capecitabina tem sido utilizada

também em pacientes com carcinomas prostáticos, pancreáticos, cabeça e pescoço, renais e ovarianos, como agente único ou em combinação com outras drogas [17, 20, 21].

1.4.2 Farmacocinética

O 5-FU tem índice terapêutico estreito e alta variação. Essa diferença no nível do plasma depende da diversidade genética em enzimas metabólicas e diferenças cinéticas em termos de idade, gênero, peso corporal e diferenças dietéticas [12].

Atualmente a terapêutica oncológica tem buscado individualizar a escolha de fármacos baseados em resultado das grandes diferenças interindividuais em termos de eficácia e toxicidade. Os fatores responsáveis pela variabilidade interindividual na farmacocinética e farmacodinâmica incluem interações medicamentosas, etnia, idade, função renal e hepática, comorbidades, estado nutricional, tabagismo, consumo de álcool e polimorfismo genético. Polimorfismo genético influencia absorção, metabolismo e eliminação de drogas, podendo alterar de forma significativa uma resposta terapêutica. Existem aproximadamente 25 genes em que variações podem afetar a eficácia de 5-FU / capecitabina [22]. Foram identificados polimorfismos no gene da dihidropirimidina desidrogenase (DPD), da metilenotetrahidrofolato redutase, da citidina deaminase e da timidilato sintase com impacto na farmacocinética do 5-FU [13, 23-25].

O pró-fármaco capecitabina é facilmente absorvido a partir do trato gastrointestinal como molécula intacta, mas é metabolizado rapidamente e extensivamente depois disso. É ativado para 5-FU via uma cascata enzimática composta por três passos: 1) Metabolização pela carboxil esterase hepática para 5'-desoxi-5-fluorocitidina (5'-DFCR). Esta enzima é localizada quase que exclusivamente no fígado e hepatoma; ela não se encontra em outros tumores ou tecidos. 2) Conversão do 5'-DFCR em 5'-desoxi-5-fluorouridina (5'-DFUR) no fígado pela citidina desaminase (CDA), uma enzima que está localizada em altas concentrações em muitos tecidos tumorais humanos e em tecido hepático saudável. A enzima envolvida na conversão final para 5-FU, timidina fosforilase (TP), é expressa nos tecidos tumorais, mas também nos tecidos normais, embora geralmente em níveis mais baixos. 3) Distribuição da capecitabina 5-FU preferencialmente ao tecido tumoral em vez de plasma e para tecido saudável adjacente (figura 4) [15, 24, 26, 27]. A expressão de TP

e da DPYD está correlacionada a uma resposta clínica favorável do uso de capecitabina em monoterapia no câncer de mama [28].

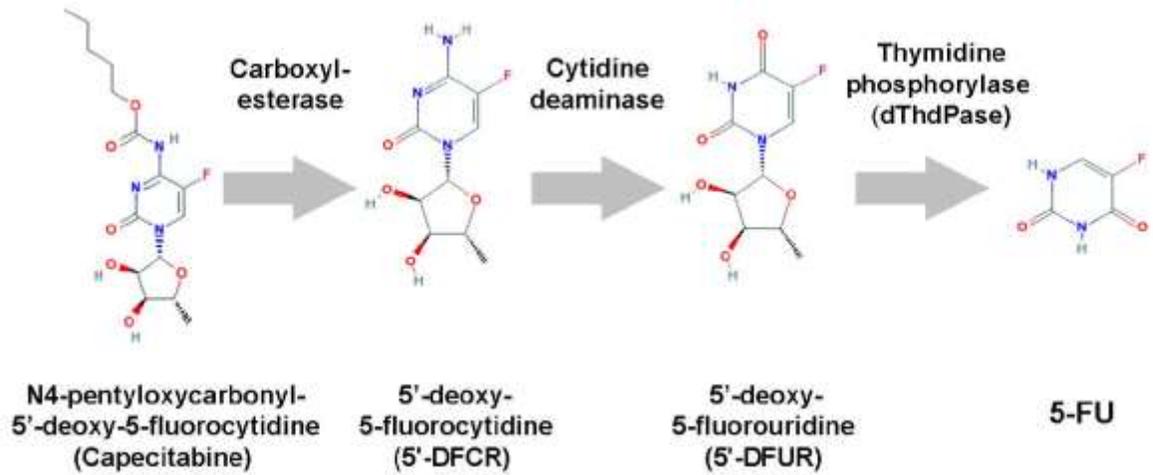


Figura 4. Metabolismo da capecitabina. Fonte: Miura *et al.*(2010) [27].

Mais de 80% de uma determinada dose é rapidamente eliminada pela DPD. A DPD é a enzima responsável pelo catabolismo de pirimidina transformando no metabólico inativo 5-fluoro-5,6-dihydrouracil (figura 5) [24, 27, 29].

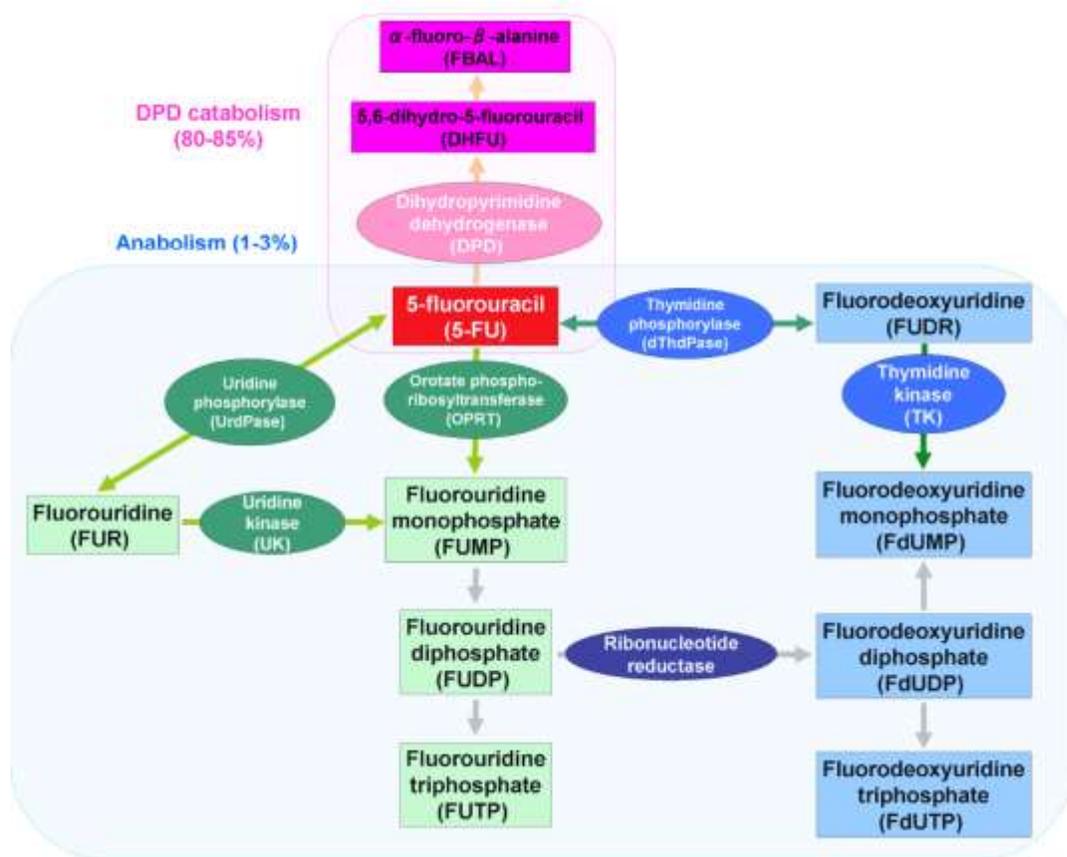


Figura 5. Anabolismo e catabolismo do 5-FU. Fonte: Miura *et al.*(2010) [27].

Após administração oral de 1250mg/m², a capecitabina é rapidamente e amplamente absorvida pelo trato gastrointestinal, apresentando biodisponibilidade de aproximadamente 100%, atingindo a concentração máxima (t_{max}) em 2 horas, com uma concentração máxima plasmática (C_{max}) de 3 a 4mg/L, Área sob a curva (ASC) de 5,96mg x h/L, além de compreender uma meia-vida de eliminação relativamente baixa (t_{1/2}:0,55 a 0,89h). A recuperação de material relacionado à droga na urina e fezes é de quase 100%. As concentrações plasmáticas de 5-FU são muito baixas, com uma C_{max} de 0,22 a 0,31mg/L e ASC de 0,461 a 0,698mg x h/L. A t_{1/2} aparente de 5-FU após a administração de capecitabina é semelhante ao do composto original endovenoso. Quando é feita a comparação das concentrações de 5-FU no tumor colorretal primário e tecidos saudáveis adjacentes após a administração de capecitabina nota-se que a capecitabina é preferencialmente ativada para o 5-FU no tumor colorretal, sendo sua concentração média 3,2 vezes maior do que no tecido saudável adjacente (p = 0,002) [30, 31].

1.4.3 Farmacodinâmica

A capecitabina é metabolizada em 5-FU causando citotoxicidade pela inibição da síntese de timidina. O 5-FU inibe o crescimento celular por conversão para metabólitos que são incorporados em ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA). Nas células tumorais, o 5-FU é ainda metabolizado em compostos citotóxicos para inibir a síntese de DNA por ligação ao timidilato sintase [26]. Apenas 1 a 3% da dose original de 5-FU vai ser responsável pelo efeito citotóxico nas células tumorais e tecidos normais, e 80% a 85% de 5-FU é catabolizado a metabólitos inativos pela DPD [27].

Uma vez convertida em 5-FU, a capecitabina interfere da duplicação e transcrição das células tumorais. A ativação enzimática de 5-FU gera vários 5-fluoronucleótidos que interferem com DNA normal e função de RNA preferencialmente em células cancerígenas. Importante enzimas envolvidas na bioativação de 5-FU e em dano de DNA / RNA são a TP e a timidilato sintase (TS) [24]. Quanto maior a expressão da enzima TP no tumor, maior será os níveis intratumorais de fármaco ativo [25]. Os metabólitos do 5-FU são os responsáveis por essa interferência. São eles: monofosfato de fluorodesoxiuridina (F-dUMP), fluorouridina-5-trifosfato (FUTP), e trifosfato de fluorodesoxiuridina (FdUTP). O primeiro inativa a TS, enzima responsável pela síntese de timina, essencial para produção e reparo de DNA. O FUTP age na transcrição, no local da uracila resultando em RNA alterado, interferindo com a síntese proteica. Já o FdUTP interfere na replicação do DNA [27, 29].

1.4.4 Contraindicações e Precauções no uso

A capecitabina é contraindicada em algumas circunstâncias como: reações graves e inesperadas às fluoropirimidinas ou hipersensibilidade à capecitabina e/ou fluorouracil; administração concomitante com sorivudina e análogos [32].

As precauções de seu uso são: em caso de diarreia, monitorar hidratação e instituir tratamento-padrão; monitorar quanto à toxicidade; no caso de hiperbilirrubinemia graus 2-4, interromper temporariamente; monitorar pacientes com disfunção hepática e renal [32].

1.4.5 Efeitos adversos

A capecitabina apresenta potencial emetogênico baixo. Em torno de 10-40% dos pacientes podem apresentar toxicidade grave e potencialmente fatal no início do tratamento, levando a uma interrupção do uso e/ou necessidade de internação [13]. Efeitos adversos são dose dependente; a dose terapêutica da capecitabina é em torno de $1250\text{mg}/\text{m}^2$, duas vezes ao dia por ciclos de 14 dias. Os efeitos colaterais podem ser piores na disfunção renal [32]. Ela apresenta de modo geral uma tolerância superior em comparação ao 5-FU, com exceção da incidência da síndrome mão-pé, que é caracterizada por dormência, disestesia/parestesia, edema ou eritema com ou sem dor, descamação, aparecimento de vesículas, sendo o efeito adverso clínico mais comum. Conhecida também por eritrodiseestesia palmo plantar, é um quadro não específico dessa droga (observado em tratamentos com 5-FU intravenoso e doxorrubicina lipossomal), porém gera desconforto importante ao paciente (Figura 6). Acredita-se que devido a atividade importante de TP em queratinócitos, há um acúmulo de metabólitos citotóxicos na pele principalmente em glândulas écrinas, o que justifica a localização da sua reação ser palmo-plantar [33].



Figura 6. Acomentimento de mãos na Síndrome mão-pé devido uso de capecitabina, com edema, eritema, fissuras e desconforto importante. Fonte: Inokuchi *et al.* (2014) [33].

Os possíveis efeitos colaterais da capecitabina estão descritos na literatura, como demonstrado na tabela 1. É de grande importância ressaltar que a capecitabina apresenta efeito citotóxico através da sua transformação em 5-FU e seus metabólitos principalmente em células com alto índice mitótico, células tumorais. Esses efeitos adversos variam de acordo com o tipo de câncer [24, 27].

Tabela 1. Observação dos efeitos adversos da capecitabina quanto a frequência e duração em pacientes.

Efeito adversos	Frequência	Aparecimento
Cardiovascular		
Tromboembolismo	Raro	Dias a semanas
Cardiotoxicidade	<5%	Dias a semanas
Hipertensão	<5%	Dias a semanas
Hipotensão	<5%	Dias a semanas
Dermatológico		
Alopécia	6%	Dias a semanas
Síndrome mão-pé	60%	Dias a semanas
Distrofia ungueal	7%	Dias a semanas
Rash	6%	Dias a semanas
Gastrointestinal		
Dor abdominal	10%	Dias a semanas
Anorexia, perda de peso	9%	Dias a semanas
Constipação	6%	Dias a semanas
Diarréia	46%	Semanas a meses
Dispepsia	5%	Dias a semanas
Hemorragia gastrointestinal	<5%	Dias a semanas
Obstrução gastrointestinal	<5%	Dias a semanas
Perforação gastrointestinal	raro	Dias a semanas
Mucosite	22%	Dias a semanas
Náuseas, vômitos	33%	Dias a semanas
Geral		
Edema	9%	Dias a semanas
Fatiga	15%	Dias a semanas
Dor	6%	Dias a semanas

Efeitos adversos	Frequência	Aparecimento
Hematológico		
Purpura trombocitopênica idiopática	rara	Dias a semanas
Mielossupressão ± infecção, hemorragia	2%	Dias a semanas
Hepatobiliar		
Alteração hepática	20%	Dias a semanas
Hipersensibilidade	<5%	Horas a dias
Dor músculo esquelética	9%	Dias a semanas
Sistema nervoso		
Confusão	<5%	Dias a semanas
Vertigem	5%	Dias a semanas
Disgeusia	6%	Dias a semanas
Cefaléia	9%	Dias a semanas
Leucoencefalopatia	Muito raro	Dias a semanas
Neuropatia	9%	Dias a semanas
Oftalmológico		
Catarata, estenose ducto lacrimal, ceratite	Raro	Dias a semanas
Nefrotoxicidade	<5%	Dias a semanas
Tosse, dispnéia	7%	Dias a semanas

1.4.6 Interações farmacológicas

Anticoagulantes cumarínicos em longo prazo, fenitoína, sorivudina e análogos podem interagir com o tratamento [32]. Por outro lado, um estudo de farmacocinética clínica, a associação anticorpo antimonoclonal bevacizumab e capacitaína não demonstrou nenhuma interação significativa entre os fármacos, demonstrando ser eficaz e seguro. Foi possível observar com esse estudo que a combinação de quimioterapia e biológicos apresentam atividade sinérgica promissora na terapia avançada de câncer colorretal [15].

1.4.7 Posologia

A dose diária recomendada é de 2500mg/m² durante duas semanas, seguidos de uma semana de descanso. Os comprimidos são administrados via oral, com água, em duas

tomadas (manhã e noite), 30 minutos após cada refeição. Sabe-se que a toxicidade pode ser controlada com sintomáticos e/ou modificação da dose. Uma vez diminuída a dose, não deverá ser aumentada posteriormente [32].

1.5 Estudos de Bioequivalência

1.5.1 Histórico

Foi a partir da década de 40 que se iniciaram estudos de biodisponibilidade, inicialmente quantificações feitas na urina e posteriormente, a partir da década de 60, técnicas mais avançadas de analítica estudando em plasma possibilitaram a comparação entre medicamentos. A utilização de estudos de bioequivalência afim de registro de medicamentos genéricos ocorreu na década de 70, primeiramente no Canadá, seguido da aprovação da Food and Drug Administration (FDA). Até esse período, não era realidade no Brasil a disponibilidade de medicamentos essenciais alternativos a preços mais favoráveis à população. A lei dos genéricos no nosso país ocorreu mais tardiamente, sendo aprovada em 1999. O Prof Dr. Gilberto de Nucci, meu orientador dessa dissertação, foi o pioneiro nesses estudos [34].

É importante ressaltar que disponibilidade de drogas mais acessíveis e novos fármacos é um tema atual no Brasil. Falta de acessibilidade a diagnóstico e tratamento é uma realidade em países em desenvolvimento. De acordo com relatório da OMS [3], a disparidade entre países desenvolvidos e em desenvolvimento é grande: “Em 2017, apenas 26% dos países de baixa renda afirmaram ter serviços de patologia geralmente disponíveis no setor público. Mais de 90% dos países de alta renda relataram serviços de tratamento estão disponíveis em comparação com menos de 30% dos países de baixa renda. Uma publicação recente de Hill *et al.* (2018) demonstra que a falta de acesso a medicamentos com preços acessíveis continua a representar uma grande fardo para a saúde global. Estima-se que um terço da população global não tem acesso regular a medicamentos essenciais de acordo com a Organização mundial de Saúde (OMS). Neste estudo os pesquisadores relataram que uma ampla gama de medicamentos listados pela OMS como essenciais podem ser fabricados como genéricos a um custo muito baixo e ainda permanecer lucrativo para as indústrias farmacêuticas [35].

O medicamento genérico proporciona redução de custos significativos, podendo chegar a uma redução de até 99% [35]. Nos Estados Unidos, por exemplo, a economia com o uso de medicamentos genéricos foi em torno de US \$ 1,5 trilhão entre 2004 e 2013 [36]. Só em 2008, 69% das prescrições nos Estados Unidos correspondiam a medicamento genéricos, gerando uma economia de 121 bilhões de dólares naquele ano [37]. Um estudo feito da Índia avaliou a redução de custo de quimioterápicos orais quando substituídos por genéricos, demonstrando uma economia em torno de 30 a 80% [38]. O medicamento genérico apresenta uma economia de pelo menos 35% em relação ao produto referência. O desconto mínimo obrigatório para compras públicas é de 24,92% de acordo com a política nacional de medicamentos [39, 40].

1.5.2. Conceitos

Produtos bioequivalentes são equivalentes farmacêuticos ou alternativas farmacêuticas que, quando administradas na mesma dose e nas mesmas condições, não apresentam diferenças significativas na quantidade de fármaco absorvido e velocidade de absorção (biodisponibilidade) [41]. Podemos definir biodisponibilidade como a fração da dose administrada do medicamento que atinge a circulação sistêmica e a taxa em que este processo ocorre [42]. Os dados de biodisponibilidade fornecem uma estimativa da fração do medicamento absorvido, bem como a sua posterior distribuição e eliminação, os efeitos dos nutrientes na absorção do fármaco, a proporcionalidade da dose, linearidade na farmacocinética das porções ativas e, se for caso, frações inativas [41].

Medicamento genérico é considerado uma cópia do medicamento referência, com a mesma segurança, potência, via de administração, qualidade, características de desempenho e indicação [43]. Estudos de biodisponibilidade são realizados para comprovar a bioequivalência de um medicamento genérico em relação ao de referência [34], podendo assim obter seu registro junto as autoridades regulatórias de medicamento.

Cabe ressaltar que todo profissional de saúde que prescreve ou libera medicamento à população deve ter conhecimento sobre o medicamento genérico. Uma revisão sistemática englobando publicações internacionais sobre o uso de medicamentos genéricos com médicos e farmacêuticos demonstrou que os profissionais estão cientes do papel dos

medicamentos genéricos na melhoria do acesso global. No entanto, em sistemas de saúde mais desenvolvidos, os profissionais demonstraram maior confiabilidade na qualidade dos medicamentos genéricos que em países em desenvolvimento. De acordo com esse estudo, farmacêuticos parecem ter melhor conhecimento do conceito de bioequivalência e aspectos dos medicamentos genéricos do que os médicos [44].

Nos estudos de bioequivalência, a biodisponibilidade de dois produtos são avaliadas e comparadas: um medicamento teste e o medicamento de referência. Para que dois medicamentos sejam considerados bioequivalentes, o princípio ativo do produto de teste deve exibir a mesma taxa e extensão de absorção do medicamento de referência. A bioequivalência é definida pelo FDA como “a ausência de uma diferença significativa na taxa e extensão em que o princípio ativo ou fração ativa em equivalentes farmacêuticos ou alternativas farmacêuticas se tornam disponíveis no local da ação de drogas quando administradas no mesma dose molar em condições semelhantes em um estudo apropriadamente desenhado” [41]. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) “Medicamentos bioequivalentes são equivalentes farmacêuticos (mesma forma farmacêutica e quantidade do mesmo princípio ativo) que, ao serem administrados na mesma dose molar, nas mesmas condições experimentais, não apresentam diferenças estatisticamente significativas em relação à biodisponibilidade” [34].

1.5.3 Estrutura dos estudos de bioequivalência

A estrutura de um estudo de bioequivalência deve seguir as recomendações de autoridades regulatórias. Ele deve ser randomizado, em dose única, cruzado e com participantes saudáveis. A utilização de pacientes só é justificável em termos de segurança. Para medicamentos de administração com alimento, como a capecitabina, é recomendado ser em dois períodos, de dois tratamentos e duas sequências [41, 43]. Na escolha de sua metodologia, ele pode ser replicado, semi replicado ou não replicado. Estudos não replicados são recomendados para medicamentos de liberação imediata e medicamento de liberação modificada, pois existe menor influência de variáveis fisiológicas. O uso de estudos replicados ou semi-replicados apresentam vantagens em relação a não replicados pois permitem comparações de variâncias intra-indivíduo, fornecem mais informações sobre os fatores intrínsecos subjacentes ao desempenho da formulação e reduz o número

necessário de participantes. Doze é o número mínimo aceitável de participantes para estudos de bioequivalência [45].

O estudo de bioequivalência pode ser dividido em três etapas são: etapa clínica, etapa analítica e etapa estatística.

A etapa clínica é constituída pela a) seleção dos participantes, b) internação, c) administração dos medicamentos teste e referência, d) coleta de amostras de sangue até alta hospitalar e e) último retorno para acompanhamento. Nessa etapa deve-se garantir a segurança de cada participante sadio, visto que sua participação no estudo não gera benefício algum para esse indivíduo. Cabe ao pesquisador principal selecionar corretamente seu participante através de um consulta médica prévia detalhada e estar atento a possíveis efeitos colaterais do medicamento em questão.

A capecitabina é administrada preferencialmente após refeição. O uso de alimento antes da administração da capecitabina se justifica pelo interesse de aumentar o pH gástrico. Estudos *in vitro* demonstraram a degradação do medicamento em meio ácido e estudos clínicos demonstraram um aumento da taxa de absorção quando em jejum porém levando a saturação do efeito de primeira passagem [46]. Estudos de bioequivalência com administração após alimentação devem ser padronizados, com intervalo de 30 minutos entre a refeição e o uso do medicamento após um jejum de no mínimo 10h e receber refeições padronizadas programadas sempre do mesmo horário em cada período do estudo [45]. Recomenda-se refeição de alto teor calórico e alto teor de gordura em estudos de bioequivalência após alimentação pois constituem o pior cenário para o desempenho da formulação [42].

A etapa analítica é composta pelos processos de: a) extração, b) separação, c) purificação, d) identificação e e) quantificação do produto teste e referência no material biológico escolhido seja sangue, soro, plasma ou urina. Essa análise é feita através de cromatografia líquida associada a espectrometria de massa [34]. É de grande importância que os métodos bioanalíticos sejam precisos, seletivos, sensíveis e reprodutíveis. Uma pré-validação é realizada afim de garantir a qualidade dessa etapa, onde é determinada a exatidão, precisão e recuperação; a linearidade e limites de quantificação; e a seletividade.

O uso de padrão interno e produto referência garantem a validade da etapa analítica, para tanto cabe citar que padrão interno é um composto de concentração previamente conhecida e análogo ao teste, e sua função é facilitar a determinação do produto teste. Uma vez o método validado, a análise das amostras pode ser efetuada, também conhecida como corrida do lote. Por fim são obtidas a curva de respostas, a análise das amostras e do controle [34].

Na etapa estatística o cálculo dos dados obtidos com a etapa analítica é realizado para avaliação da bioequivalência. As medidas farmacocinéticas são usadas para avaliar o perfil das drogas. Esse princípio de bioequivalência data do início dos anos 90, definido como aceitação de um intervalo de 20% (80–125%) com intervalo de confiança de 90% da razão das médias geométricas entre o produto teste e o referência após a transformação do log dos parâmetros farmacocinéticos: Concentração máxima (C_{max}) e Área sobre a curva (ASC) [47].

A bioequivalência é avaliada por três parâmetros farmacocinéticos da biodisponibilidade das formulações teste e referência (Figura 7) [34]:

- ASC: Área sobre a curva das concentrações plasmáticas - Quantifica o fármaco absorvido e a disponibilidade para chegar ao local de ação, a extensão da absorção após uma única dose;
- C_{max}: Concentração máxima do fármaco na corrente sanguínea;
- T_{max}: Tempo necessário para alcançar a C_{max}.

Esses parâmetros farmacocinéticos são considerados desfechos substitutos válidos para a eficácia clínica e segurança sob as condições estritas de um estudo de bioequivalência pois, na realidade, apresentam maior sensibilidade na detecção de diferenças entre produtos do que desfechos clínicos [42].

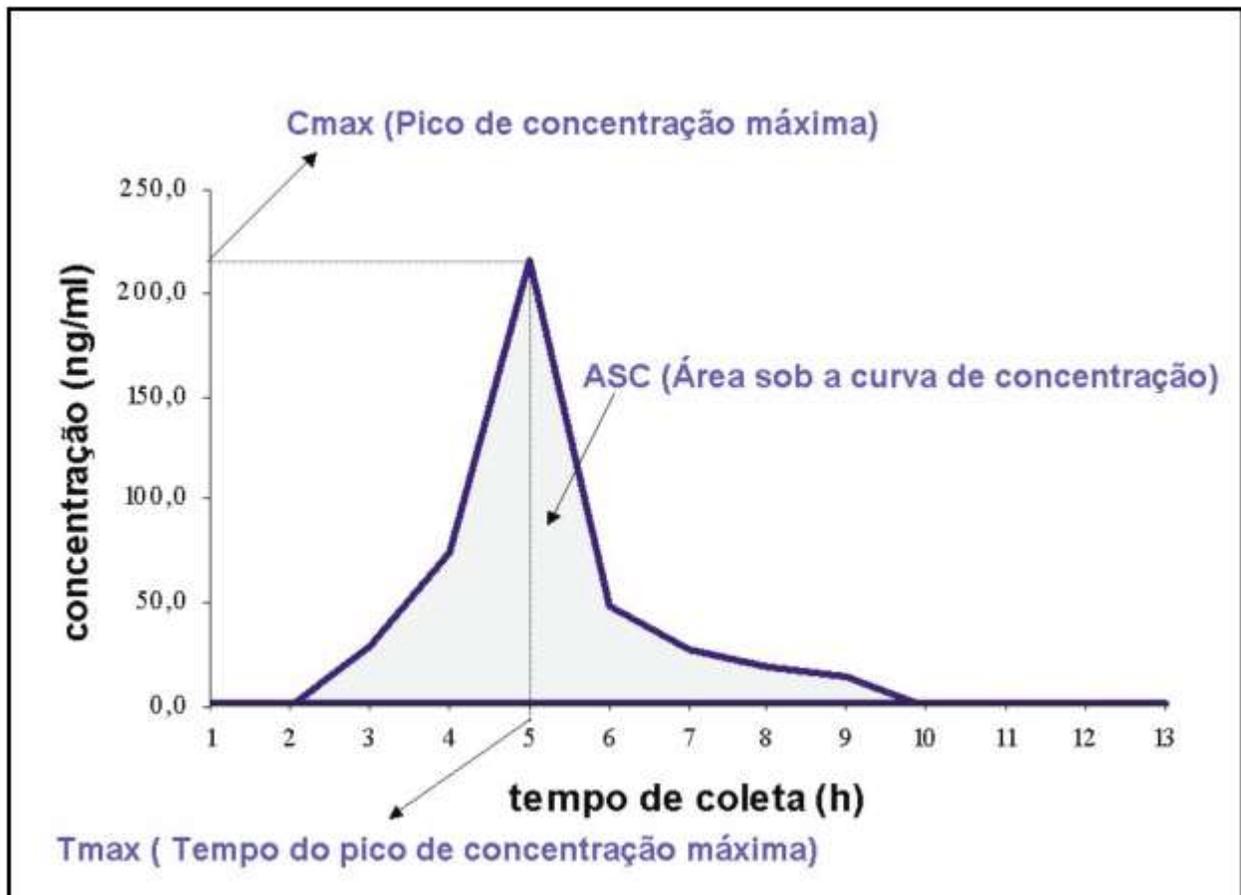


Figura 7. Curva de concentração plasmática pelo tempo de coleta demonstrando o pico de concentração máxima (C_{max}) definindo o T_{max} (tempo em que a C_{max} foi atingida) e delimitando a ASC. Fonte: Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade Bioequivalência, ANVISA (2002) [34].

De acordo a ANVISA nos estudos de dose única, a medida da exposição total é ASC do tempo zero para o tempo t (ASC_{0-t}), onde t é o último ponto de tempo com concentração que foi quantificado; ASC do tempo zero para o infinito de tempo (ASC_{0-inf}), onde $ASC_{0-inf} = ASC_{0-t} + C_t / \lambda_z$, C_t é a última concentração quantificada e λ_z é a taxa de eliminação constante calculada, e é importante que a meia-vida ($t_{1/2}$) do medicamento também seja relatada [34].

1.6 Justificativa do estudo

O câncer ainda é e será por longas décadas um grande desafio para a sociedade. Todo estudo em oncologia pode fornecer novos conhecimentos e proporcionar avanços na luta contra o câncer. Nessa perspectiva buscar medidas para reduzir despesas e medicamentos de baixo custo se faz necessário. Sabendo que medicamento genérico proporciona importante redução de custos, podendo chegar a uma redução de até 99%

[35], nosso estudo visou contribuir com a redução de custos na área da saúde através da viabilização da forma genérica da capecitabina .

2 OBJETIVOS

O objetivo primário deste estudo foi avaliar comparativamente a biodisponibilidade de 2 produtos (teste e referência) a fim de determinar a bioequivalência entre eles e, com isso, obter o registro para comercialização de um medicamento genérico.

Os objetivos secundários foram:

- avaliação da variabilidade intra-individual através da administração do produto referência por duas vezes;
- avaliação da segurança e da tolerabilidade.

3. METODOLOGIA

3.1 Desenho do estudo

Estudo Fase IV, monocêntrico, aberto, randomizado, cruzado, semi-replicado, com 2 administrações, 3 períodos (3 sequências), nos quais os participantes receberam, em cada período distinto, a formulação teste (1 ocasião) ou a formulação referência (em 2 ocasiões), após a ingestão de alimentação padronizada, havendo por conseguinte 3 braços de administrações. Os participantes foram randomizados em uma das três sequências de administração: referência- referência -teste (RRT), referência- teste-referência (RTR), teste-referência- referência (TRR).

As formulações foram administradas em dose única por via oral seguidas de coletas de sangue de pelo menos 3 meias-vidas. O intervalo de administração da medicação entre os períodos do estudo foi de 7 dias (período de *washout*).

3.2 Ética em Pesquisa

Este estudo foi realizado de acordo com as diretrizes de Boas Práticas Clínicas, com a Declaração de Helsinki (1964) e suas revisões [48, 49].

O protocolo do estudo foi submetido e avaliado pelo comitê de ética da Universidade Estadual de Campinas (parecer n 969.185, em anexo), sendo seu início dado somente após aprovação. Todos os participantes leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes de serem incluídos no estudo.

3.3 Etapa Clínica

3.3.1 População de Estudo

Os participantes do estudo foram avaliados clinicamente, obtendo-se os dados da história médica e exame físico, garantido assim o respeito de todos os critérios de inclusão e exclusão.

Os participantes do estudo foram submetidos aos seguintes exames laboratoriais por ocasião do recrutamento:

Quadro 1. Exames laboratoriais vinculados ao processo de seleção dos participantes.

Categoria	Exames
Análise hematológica	Hemoglobina, hematócrito, contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de glóbulos vermelhos, contagem de plaquetas.
Análise Bioquímica	Uréia, creatinina, bilirrubina total, proteínas totais, albumina, glicose em jejum, fosfatase alcalina, TGO, TGP, colesterol total, triglicérides, ácido úrico e GT.
Urina	Sumário de Urina (urina I)
Fezes	Protoparasitológico
Sorologia	Análise Sorológica para: hepatite B (HBsAg e Anti-HBc), hepatite C (HCV) e HIV(1+2)

O mesmo perfil de exames, com exceção dos testes sorológicos e protoparasitológico de fezes, foi realizado após a fase de tratamento.

3.3.2 Critérios de inclusão e exclusão

Critérios de Inclusão

1. Participantes do sexo masculino com idade acima de 18 anos;
2. Participante com índice de massa corpórea maior ou igual a 19 e menor ou igual a 30;
3. Boas condições de saúde ou sem doenças significativas, a juízo médico, de acordo com as regras definidas no protocolo, e avaliações a que foi submetido: história clínica, medidas de pressão e pulso, exame físico e psicológico, eletrocardiograma (ECG), e exames laboratoriais complementares;

4. Capaz de compreender a natureza e objetivo do estudo, inclusive os riscos e efeitos adversos e com intenção de cooperar com o Pesquisador e agir de acordo com os requerimentos de todo o ensaio, o que vem a ser confirmado mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Crítérios de Exclusão

- Problemas relacionados com a droga:

1. História de hipersensibilidade a capecitabina ou a compostos quimicamente relacionados; história de reações adversas sérias ou hipersensibilidade a qualquer droga;
2. História ou presença de doenças ou outra condição que poderiam interferir com a absorção, distribuição, excreção ou metabolismo do fármaco em estudo;
3. Uso de terapia de manutenção com qualquer droga.

- Doenças ou problemas de saúde:

4. História de doença hepática, renal, pulmonar, gastrintestinal, epiléptica, hematológica ou psiquiátrica; hipo ou hipertensão de qualquer etiologia que necessite de tratamento farmacológico; história de infarto do miocárdio, angina e/ou insuficiência cardíaca ou outra comorbidade que, a juízo do pesquisador, poderia interferir na participação do estudo ou que expunha o sujeito de pesquisa a risco adicional do que normalmente previsto;

5. Achados eletrocardiográficos não recomendados a critério do pesquisador para participação no estudo;

6. Resultados dos exames laboratoriais de triagem com desvios considerados clinicamente relevantes pelo pesquisador.

- Hábitos e Dependências:

7. Tabagismo;

8. Ingestão de mais que 5 xícaras de café ou chá por dia;

9. Hábitos alimentares incomuns, p.ex., vegetarianos;

10. História de abuso de álcool ou drogas ou consumo expressivo de álcool (> 35 g/dia).

- Condições encontradas nos dias/meses que antecedem o estudo

11. Uso de medicação regular dentro das 2 semanas que antecederam o início do tratamento, ou uso de qualquer medicação dentro de uma semana;

12. Vacinação durante os 30 dias precedendo a internação;

13. Internação por qualquer motivo até 8 semanas antes do início do primeiro período de tratamento deste estudo;

14. Tratamento dentro dos seis meses prévios ao estudo com qualquer droga conhecida de ter um potencial tóxico bem definido nos grandes órgãos;

15. Participação de qualquer estudo experimental ou ingestão de qualquer droga experimental dentro dos seis meses que antecedem o início deste estudo;

16. Doação ou perda de 450 ml ou mais de sangue durante três meses que antecederam ao estudo ou efetuou 4 doações dentro dos 12 meses que precederam o estudo.

- Outras condições

17. Pretensão de engravidar parceira durante o período de estudo e/ou não concorda em utilizar preservativo em todas suas relações sexuais durante o período do estudo;

18. Qualquer condição que impede de participar do estudo segundo julgamento do pesquisador.

3.3.3 Formulações sob investigação

Produto teste : Capecitabina 150mg (número do lote: 420/14; data de validade: Agosto 2017, Eurofarma Laboratórios S.A.).

Produto referência: Xeloda® 150mg (Capecitabina, número do lote X3365B08, data de validade: Fevereiro 2016, Roche Químicos e Farmacêuticos S.A.).

Os participantes do estudo receberam, após alimentação padronizada em cada um dos períodos de internação, 150 mg de uma das formulações por via oral em dose única, com um copo de água mineral sem gás (200 mL) à temperatura ambiente, seguindo a randomização. Após a ingestão foi feita checagem para confirmar a deglutição do medicamento em sua totalidade.

3.3.4 Internação dos participantes

Os participantes do estudo foram internados no CENTRO AVANÇADO DE ESTUDOS E PESQUISAS LTDA – CAEP., à Rua José Ceberino Christóforo, 245 Fazenda Santa Cândida - Campinas – SP.

Após a triagem, os indivíduos que se qualificaram foram confinados por 3 períodos de aproximadamente 38 horas. Cada confinamento teve um intervalo de 1 semana. Durante cada período, os participantes do estudo deram entrada na unidade de internação a partir das 18 horas do dia anterior à administração da medicação. Após o registro, os mesmos foram encaminhados à ala de internação, onde se procedeu a guarda dos pertences individuais e foi oferecido jantar. Eles permaneceram na área de recreação, observando-se as restrições quanto a exercícios físicos e cumprimento específico da programação alimentar prevista no protocolo. Após uma noite de 8 horas em jejum, um café da manhã rico em gordura de 800 calorias foi oferecido e uma única dose de 150 mg da formulação de capecitabina foi administrada juntamente com 200 mL de água mineral sem gás, 30 minutos após a alimentação.

3.3.5 Dieta

A fim de manter a padronização dos grupos de tratamento, a dieta (alimentos e líquidos) oferecida obedeceu ao mesmo padrão para todos os participantes em ambos os períodos. Nenhum outro alimento foi permitido durante internação.

Adicionalmente, os participantes observaram restrição hídrica desde 2 horas antes até 2 horas após a administração da medicação em cada período, exceção feita a ingestão de 200mL de água no momento da administração da medicação.

Todos os participantes do estudo receberam um jantar aproximadamente às 19:00 horas e encerraram a ceia por volta das 21:00 horas. Os participantes do estudo receberam um desjejum padronizado, oferecido 30 minutos antes do horário da medicação. Durante a internação também não foi permitida a ingestão de qualquer outro alimento (incluindo doces, pastilhas, gomas, chicletes, pastilhas para garganta, salgadinhos ou biscoitos de qualquer tipo), além da dieta programada para o protocolo. Não foi permitido, desde 12

horas antes da administração até a última coleta de sangue de cada período de tratamento, o consumo de cafeína, bebidas que contivessem xantina (chá, café ou cola) e bebidas alcoólicas. Também foi solicitada a limitação do consumo de bebidas alcoólicas durante toda a etapa clínica.

Foi providenciado para que a eventual não observância destas restrições fosse informada ao pesquisador para que este decidisse quanto à permanência do participantes no estudo.

3.3.6 Restrições

Algumas restrições e proibições antes, durante e após o estudo foram aplicadas, com o objetivo de controlar possíveis fatores externos que poderiam interferir nos resultados deste estudo. Foram elas:

3.3.6.1 Medicamentos

Todos os participantes do estudo foram informados que, qualquer medicamento, incluindo aqueles vendidos sem prescrição médica, não poderiam ser utilizados de forma regular por no mínimo 14 dias antes do início do primeiro período do estudo e, mesmo que de forma irregular, dentro de 7 dias antes do início do primeiro período do estudo. Durante a fase do estudo (administrações ou intervalo entre elas) também não foi permitida qualquer medicação concomitante, inclusive aquelas vendidas sem prescrição médica. Na ocorrência de ingestão de medicamentos, o pesquisador avaliou se, com base na meia-vida do fármaco e/ou metabólitos ativos, poderia ser assumida a completa eliminação da medicação, e, por conseguinte, a não interferência com a condução do estudo.

Em casos de emergência, incluindo eventos adversos, o pesquisador poderia decidir em administrar medicações consideradas absolutamente necessárias para o bem estar dos participantes.

3.3.6.2 Outras Restrições quanto a Terapias e Condutas

Foi solicitado que nos dias de confinamento, da noite anterior a administração até 4 horas após a administração, que o participante reduzisse as suas atividades físicas ao mínimo.

Certificou-se quanto a interdição do fumo ou uso de drogas, doação de sangue e demais restrições constantes nos critérios de exclusão/desligamento do estudo.

Foi também solicitado que à equipe médica fosse comunicada a eventual perda involuntária de sangue de qualquer participante.

3.3.7 Segurança

Todos os eventos adversos foram registrados em detalhes na(s) folha(s) apropriada(s) para o relato de eventos adversos, integrantes do caderno de registro de dados (CRF) de cada participante do estudo, avaliados pelo pesquisador principal e acompanhado até resolução completa.

3.3.8 Critérios de retirada

Solicitação por parte do participante para se retirar do estudo a qualquer momento:

1 Participante não deseja continuar no estudo por razões pessoais (ou mesmo sem razão);

2 Participante não deseja continuar no estudo devido os eventos adversos da droga de estudo (efeitos não desejáveis possivelmente relacionados a droga em estudo);

3 Participante não deseja continuar por razões outras que não efeitos adversos, por exemplo, indisponibilidade, intolerância aos procedimentos do estudo, sinais ou sintomas pré-tratamento;

O Pesquisador poderia retirar o participante do estudo por uma das seguintes razões:

4 Não aderência às exigências do protocolo;

5 Eventos adversos ou sintomas ou sinais de possível toxicidade;

6 Doença intercorrente requerendo medicação;

7 Resposta positiva à reavaliação de qualquer um dos critérios de exclusão, no momento da admissão ao primeiro período de tratamento ou em ocasião subsequente;

8 Qualquer outra condição que, a juízo do pesquisador, seja do interesse para manutenção da saúde do participante;

Retirada devido a vômito:

9 Participante que vomitasse após a ingestão do medicamento até o dobro do tempo do T_{max} do ingrediente ativo (conforme documentado em função da medicação teste); no caso, participante com histórico de vômito dentro de 8 horas após a administração deveria ser excluído.

3.3.9 Coleta de amostras

A coleta das amostras foi realizada através de cateter venoso introduzido em veia superficial do antebraço do participante do estudo e mantido desobstruído com o auxílio de injeção de 1 mL de solução de heparina. Para proceder a coleta, cerca de 1 mL de sangue foi retirado e desprezado para eliminar a heparina e, após, coletada a amostra de sangue pertinente. Por fim o acesso era novamente heparinizado com a injeção de 1 mL da solução de heparina a fim de conservar o acesso venoso. Apenas no primeiro período foi coletada uma amostra de sangue de 40 mL para controle individual do método; para as demais ocasiões foram coletadas amostras de sangue de 5 mL, com o emprego de seringas descartáveis, sendo a matriz biológica imediatamente transferida para tubos previamente identificados e heparinizados. Para controlar a possibilidade de equívoco quanto ao tubo utilizado, uma etiqueta de identificação dos mesmos foi transferida para o local apropriado do CRF, para de cada uma das coletas realizadas.

Os tempos de coleta foram 0 hora (pré-dose) e: 0,083; 0,17; 0,25; 0,33; 0,5; 0,67; 0,83; 1; 1,17; 1,33; 1,5; 1,67; 1,83; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 5; 6 e 7 horas após a administração da medicação. Os tempos reais das coletas das amostras foram controlados usando um relógio de 24 horas.

3.3.10 Processamento, armazenamento e transporte das amostras

Após as coletas, as amostras de sangue foram encaminhadas à sala de processamento e armazenamento onde foram centrifugadas a uma rotação correspondente a 2000G por 10 minutos. Após a centrifugação para separação do plasma, o mesmo foi transferido para um tubo criogênico, igualmente identificado.

O controle quanto à transferência para o tubo correto foi realizado através de um sistema de controle e identificação dos tubos por meio de códigos-de-barras.

Uma vez concluída a conferência dos procedimentos de transferência, os tubos criogênicos foram armazenados em freezer específico para armazenagem de amostras biológicas, localizado na Unidade de Internação e mantido à temperatura de cerca de -20°C , monitorada através de termômetro calibrado.

As amostras foram transferidas da Unidade de Internação para a Unidade Central de Armazenamento Galeno em 11.06.15 e 29.06.15 por intermédio de empresa especializada para transporte de amostras biológicas. As amostras foram colocadas em caixas térmicas contendo gelo seco, sendo que a temperatura durante o transporte foi monitorada por termômetro de máxima e mínima, calibrado. Os tempos dispendidos para o transporte das amostras foram inferiores a 0:40 h, sendo que as mesmas permaneceram a uma temperatura abaixo de -50°C . As amostras foram armazenadas em freezer específico e mantidas à temperatura de cerca de -20°C , monitorada através de termômetro calibrado.

Em 16.07.15 as amostras foram transferidas para o Centro Analítico MAGABI por intermédio de empresa especializada para transporte de amostras biológicas. As amostras foram colocadas em caixas térmicas contendo gelo seco, sendo que a temperatura durante o transporte foi monitorada por termômetro de máxima e mínima, calibrado.

Foram transferidas um total de 5279 amostras de participantes, bem como as amostras para controle do método.

3.4 Etapa Analítica

A quantificação das concentrações plasmáticas de capecitabina foi realizada através de métodos analíticos específicos e validados, baseado na aplicação de um modelo não compartimental próprio para avaliação destas concentrações, utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficácia acoplada a Espectrometria de Massas (HPLC-MS/MS) com ionização por eletrospray positiva usando monitoramento de múltiplas reações.

O uso clínico da HPLC-MS/MS iniciou-se com a necessidade de monitoramento terapêutico de drogas de imunossupressores, sendo a ciclosporina e tacrolimus os primeiros ensaios a serem desenvolvidos, seguido de análises de toxicologia já que essa metodologia permite a quantificação tanto de uma droga desconhecida como realizar triagem direcionada para um medicamento específico identificado previamente [50]. A utilização desse equipamento para estudos de bioequivalência é bem descrito na literatura [51-53].

A cromatografia líquida é um excelente método de separação, de quantificação de moléculas. O processo passa por uma fase móvel com um solvente fluido para carregar o analito, sendo introduzida no equipamento e misturada ao plasma, e depois passa a fase estacionária obtendo assim a separação dos componentes. Porém somente essa técnica não é suficiente para uma análise qualitativa, ou seja, identificação ou confirmação da substância que está sendo analisada. Por isso, a espectrometria de massa é o “parceiro” ideal para complementar essa técnica, permitindo a avaliação qualitativa. O espectrômetro de massa funciona convertendo as moléculas do analito para um estado carregado (ionizado), com análise subsequente dos íons e seus fragmentos produzidos durante a processo de ionização, com base na sua relação massa / carga (m/z), possibilitando assim a medida qualitativa e quantitativa de uma amostra [54, 55].

Resultados dessa quantificação realizada no estudo piloto da capecitabina [56] segue em ilustração abaixo. Podemos observar a avaliação de plasma sem capecitabina onde não há pico, o pico de capecitabina no limite inferior e o superior (Figura 8, 9 e 10, respectivamente).

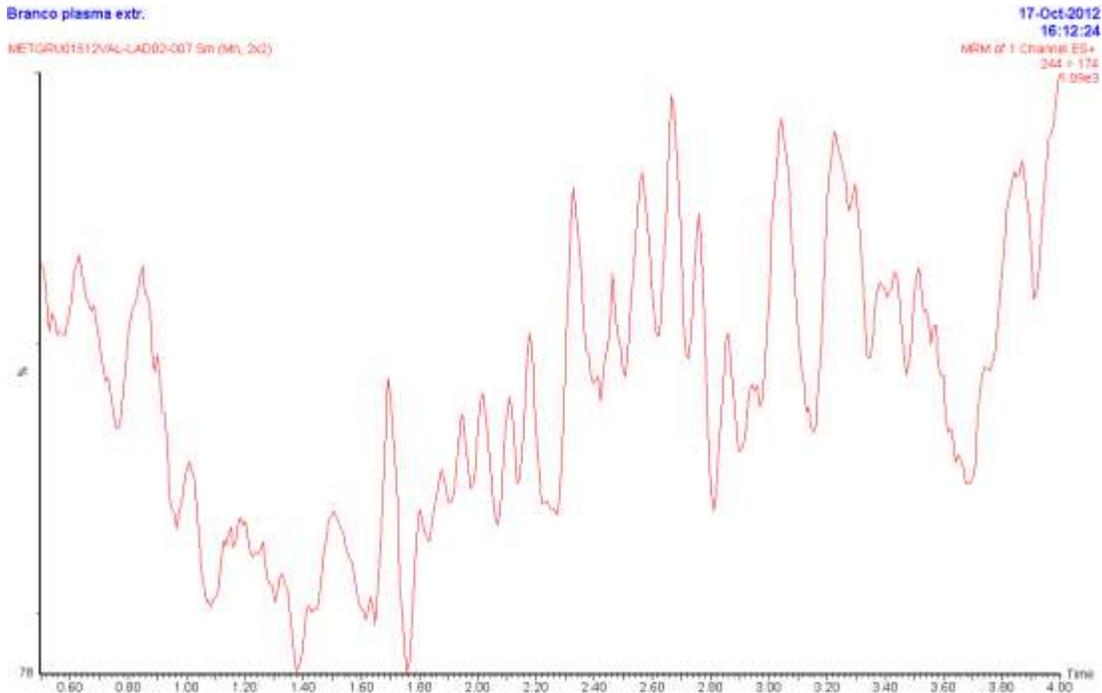


Figura 8. Análise de plasma dos participantes antes da administração do medicamento. Gráfico sem pico, pois não houve a identificação de nenhuma substância. Fonte: Mendes *et al.* (2011) [56].

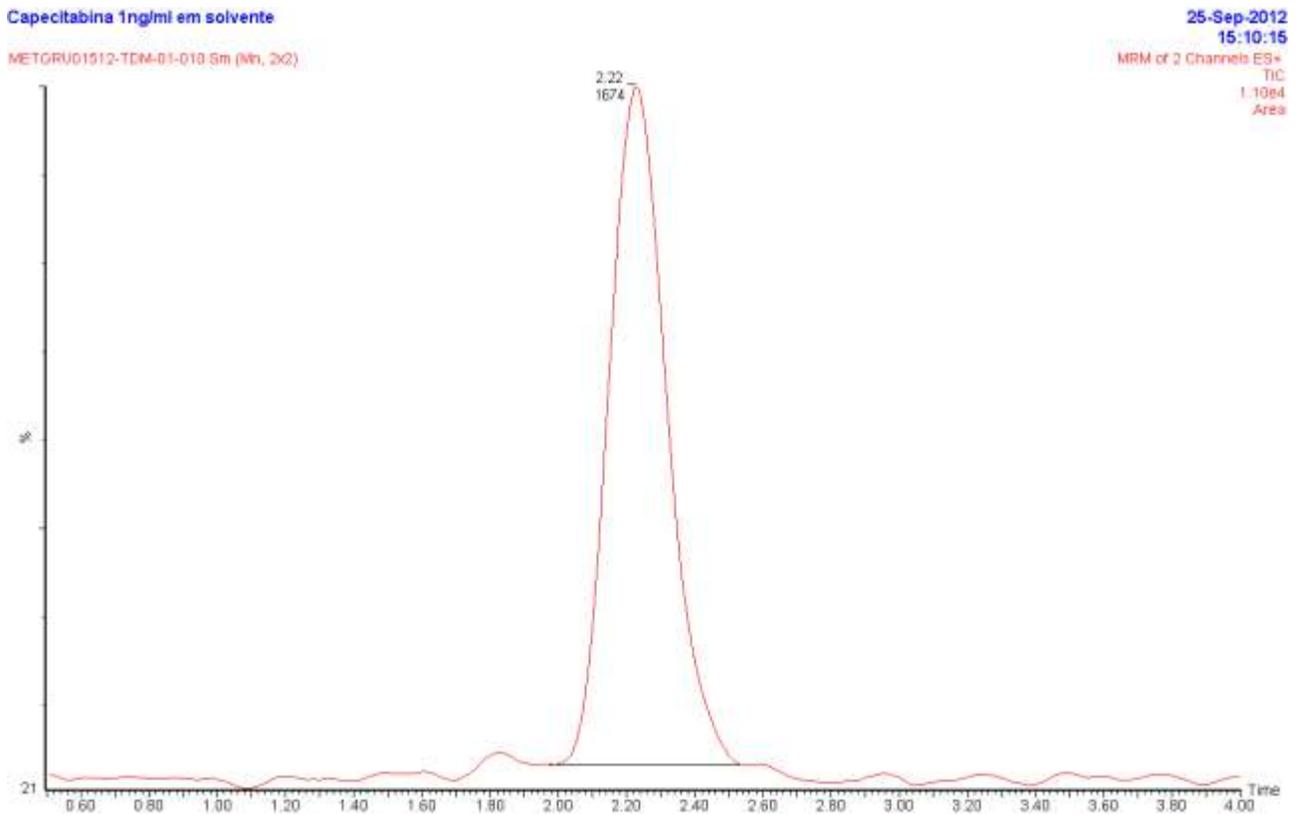


Figura 9. Análise cromatográfica da Capecitabina, produzindo pico, sendo identificada no limite inferior de detecção. Fonte: Mendes *et al.* (2011) [56].

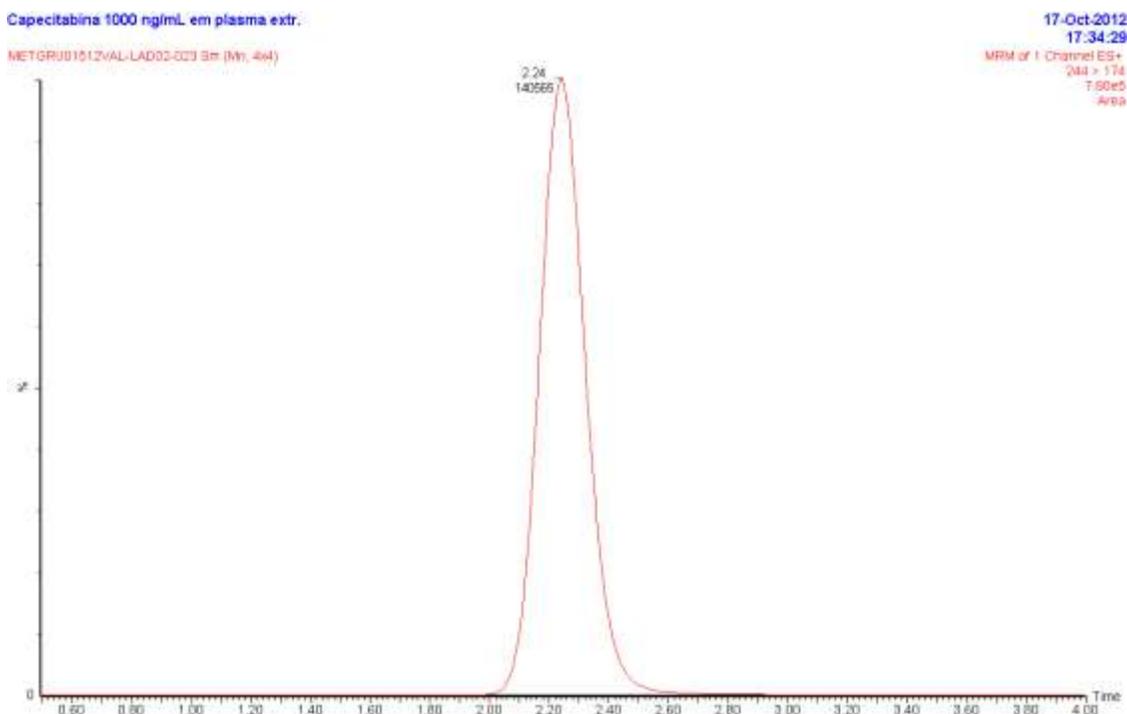


Figura 10. Análise cromatográfica da Capecitabina, produzindo pico, sendo identificada no limite superior de detecção. Fonte: Mendes *et al.* (2011) [56].

3.4.1 Descrição dos reagentes, instrumentos, equipamentos e padrões

Os equipamentos, solventes e reagentes assim que os materiais utilizados para fase analítica estão descritos nos quadros abaixo (Quadro 2, 3 e 4).

Quadro 2. Descrição dos equipamentos de LC-MS/MS.

Sistema LC-MS/MS	MS01/ SK01		
Componente	Fabricante, País	Modelo	Número de série
Conditioned Stacker	Spark, Holanda	931	50028
Reliance	Spark, Holanda	930	50028
Bombas HPLC	Spark, Holanda	750	50040/50041
Degasser	Agilent Technologies, Japão	G1379A	JP40722995
Forno	Agilent Technologies, Alemanha	G1316B	DE60557424
Espectrômetro de Massas	Sciex/ Applied biosystems, Canadá	API5000	AG00830504
Fonte	Sciex/ Applied biosystems, Canadá	Electrospray	020183060720
Sistema de dados-MS	Sciex/ Applied biosystems, Canadá	Analyst v1.4.2	-
Sistema de dados – extrator online	Spark, Holanda	Symbiosis Pharma for Analyst release 1.0 sp4	-

Quadro 3. Descrição dos solventes e reagentes.

Reagente	Descrição	Fabricante, País
Metanol	Grau HPLC	Millipore, Brasil
Acetonitrila	Grau HPLC	Carlo Erba, Itália
Água deionizada	Ultrapura	Carlo Erba, Itália
Éter etílico	Grau analítico	Macron, México
Diclorometano	Grau analítico	Carlo Erba, Itália
Ácido fórmico 88%	Grau analítico	J.T. Baker, México

Quadro 4. Descrição dos materiais e instrumentos de analítica.

Instrumentos	Fabricante, País
Pipetas automáticas (P20, P100, P200, P1000, P10mL, C1200, C300)	Gilson, França
Ponteiras descartáveis - 5 - 200 μ L, 200 - 1000 μ L e 1 - 10 mL	Axygen, EUA
Tubos de vidro 13 x 100 mm e 12 x 75 mm	Tubonew, Brasil
Pipeta de repetição	Eppendorf, EUA
Microtubos tipo Eppendorf	Axygen, EUA
Tubos de centrífuga de 50 e 15 mL	TPP, Suíça
Misturador tipo vórtex	Scientific Industries, EUA
Mesa agitadora	VWR, EUA
Balança analítica	Mettler Toledo, Suíça
Dispensador	Brand, Alemanha
Ultra Freezer	Sanyo, Japão
Centrífuga	Thermo Electron, EUA
Secador de Amostras	Caliper LifeSciences, EUA
Secador de Amostras	Tecnal, Brasil
Placa de 96 poços, capacidade 1000 μ L	Axygen, EUA
Selo de silicone	Axygen, EUA

O analito neste estudo foi a capecitabina e o padrão interno a capecitabina delterada (capecitabina-d11) podendo ser identificada facilmente pelo método bioanalítico escolhido (vide quadro 5).

Quadro 5. Descrição dos padrões de referência : analito e padrão interno.

Nome usual	A ser utilizado como	Fabricante/ País	Fornecedor/ país	Lote	Data de validade
Capecitabina	Analito	USP/EUA	USP/EUA	G0J205	30/04/2016
Capecitabina-d11	Padrão interno	TRC/Canadá	TRC/Canadá	4-CHZ-132-1	23/11/2017

3.4.2 Recebimento e armazenamento das amostras

As amostras foram recebidas no laboratório bioanalítico de acordo com o procedimento operacional do laboratório. Todas as amostras foram conferidas comparando-se os rótulos dos tubos com a informação contida na carta de envio de amostras proveniente da parte clínica do ensaio. Também foram confrontadas as condições de transporte e armazenamento com o protocolo clínico do estudo. As amostras assim conferidas e organizadas foram estocadas para análise posterior em freezers a -20°C. Além disso, foi aberta uma cadeia de custódia das amostras do estudo para controle das mesmas. Após a conclusão do estudo analítico, o conteúdo remanescente das amostras (5279 ao todo) permaneceu estocado nas mesmas condições até o descarte das mesmas após autorização pelo pesquisador.

3.4.3 Cálculo de concentração das amostras

O cálculo da concentração das amostras desconhecidas foi com base na construção de uma curva de calibração construída para cada analito dentro do sistema de dados do software Analyst versão 1.4.2. A função aplicada às diferentes amostras da curva de calibração foi calculada por um sistema de regressão linear ponderada utilizando a relação área do analito e área do padrão interno (resposta) proveniente dos respectivos cromatogramas. Esta função foi previamente validada conforme disposto nas legislações vigentes. As amostras de branco, zero ou rejeitadas pelos critérios de aceitação/rejeição não foram utilizadas para a construção da curva de calibração. As respostas provenientes de cada amostra desconhecida foram, então, interpoladas pelo próprio software na curva de calibração a fim de proporcionar a concentração do composto de interesse.

3.4.4 Calibração, soluções padrão e controle de qualidade de amostras

3.4.4.1 Padrões de calibração e controles de qualidade

Soluções de estoque de capecitabina (analito) e o padrão interno (PI) capecitabina d-11 foram preparados em metanol/água (80:20, v/v) em concentrações de 1mg/mL.

As curvas de calibração da capecitabina foram preparadas por pico de plasma em branco em concentrações de 1,0; 2,0; 10,0; 50,0; 200; 500; 750; e 1000ng/mL e cada concentração foi analisada em duplicado.

O controle de qualidade das amostras foram preparadas diariamente em plasma em branco a concentrações de 3,0; 150; 400 e 800ng/mL.

Para cada validação foram analisados oito para cada nível de controle de qualidade (três validações foram realizadas). As amostras de plasma com pico (padrões e controles de qualidade) foram extraídos em cada lote analítico, juntamente com as amostras desconhecidas.

3.4.4.2 Preparação das soluções primárias

As soluções primárias foram preparadas a partir da pesagem do padrão respectivo com uma precisão de $\pm 0,01$ mg. Todas as pesagens foram registradas adequadamente na documentação do estudo. A descrição detalhada da preparação está nas tabelas a seguir:

Tabela 2. Preparação da solução primária do analito para as curvas de calibração e controles de qualidade.

Solução mãe	Capecitabina	
Código de identificação	PH08601M1Q05	
Data da pesagem	30-jun-15	
Data do preparo da solução	30-jun-15	
Massa pesada	4,06800	Em mg
Fator de pureza	0,99700	-
Fator de correção	1,00000	-
Volume adicionado	5,00000	Em mL
Conc. Final	0,81116	Em mg/mL
Solvente utilizado	Metanol/água (80/20; v/v)	

Tabela 3. Preparação da solução primária do padrão interno.

Solução mãe	Capecitabina d-11	
Código de identificação	PH08601M2103	
Data da pesagem	07-jul-15	
Data do preparo da solução	07-jul-15	
Massa pesada	1,00000	Em mg
Fator de pureza	0,98000	-
Fator de correção	1,00000	-
Volume adicionado	1,50000	Em mL
Conc. Final	0,65333	Em mg/mL
Solvente utilizado	Metanol/água (80/20; v/v)	

3.4.5 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas escolhidas foram baseadas em estudo prévio (estudo piloto da capecitabina) assim que na metodologia descrita em literatura. Os parâmetros utilizados seguem abaixo (quadro 6):

Quadro 6. Condições cromatográficas e de extração.

Código da coluna	Col-095
Temperatura da coluna	40° C
Fluxo da fase móvel	1,20mL/min
Pressão da Coluna	105 Bar
Temperatura do amostrador	6° C
Loop de amostragem	20 uL
Volume de injeção	40 uL
Tempo de corrida	2,75 min
Tempos de retenção	1,90 ± 0,29 min. Capecitabina 1,84 ± 0,28 min. Capecitabina-d11
Tipo de integração	Base-to-base
Número de Smooth	3 Capecitabina 3 Capecitabina-d11
Tipo de extração	Líquido-líquido
Anticoagulante	Heparina

As condições de detecção do analito e do padrão interno encontrados na validação desta metodologia foram as seguintes (tabela 4):

Tabela 4. Descrição das condições de detecção.

Nomes dos compostos	Precursor ion	Product ion	Dwell time (msec)	CE (volts)	CXP (volts)
Capecitabina	360,2	244,2	100	19	18
Capecitabina-d11	371,1	255,1	100	19	18

CE=collision energy ; CE=collision exit potencial.

3.4.6 Validação do método bioanalítico

Conforme recomendações do manual de boas práticas em bioequivalência e biodisponibilidade da ANVISA [34], estudos preliminares de validação foram efetuados. Introduziu-se 0,2 mL de cada amostra de plasma no tubo de vidro seguido por 0,05 mL da solução de padrão interno (PI) (50 ng / mL). O PI usado foi a capecitabina-d11. Os tubos

foram misturados brevemente com vortex e os compostos de interesse foram extraídos com 1 mL de éter / diclorometano (70/30; v / v). Essa solução foi misturada com vortex por aproximadamente 30s. As amostras foram então centrifugadas a 2000G durante 3 min. A fase superior (fase orgânica) foi então transferida para outro teste de limpeza e evaporada sob N₂ a 40° C. Os resíduos secos foram reconstituídos com 0,2 mL de metanol / água (70/30; v/v) + ácido fórmico 3mM e misturado com vortex por 10s. As soluções foram então transferidas para os microvivos do auto-injetor. A HPLC foi realizada em C18, 5 µm (50 x 4,6 mm i.d., Phenomenex, Gemini) a um caudal de 1,2 mL/min a 40° C. A pressão do sistema era de aproximadamente 105 bar. A fase móvel foi metanol / água (55/45; v / v) + ácido fórmico 3 mM. A temperatura do auto-amostrador foi mantida a 6 ± 2 °C e o volume de injeção foi de 0,04 mL. Os tempos típicos de retenção padrão foram $1,90 \pm 0,29$ min para a capecitabina e $1,84 \pm 0,28$ min para o padrão interno, e o tempo de execução total foi de 2,75 min.

O espectrômetro de massa (API 5000) equipado com uma fonte de eletroporação usando um eletrodo contador de fluxo cruzado foi executado em modo positivo (ES +) com monitoração de reação múltipla (MRM). O espectrômetro de massa foi ajustado da seguinte forma: $360.2 > 244.2$ e $37 / 1.1 > 255.1$, para capecitabina e d11-capecitabina, como os íons precursores m / z e os respectivos íons produto. A temperatura do bloco de origem foi ajustada em 6000C e a voltagem do turbo ion spray para 4.5 kV. O nitrogênio foi usado como gás de colisão. Para a capecitabina e padrão interno, o potencial de desenganche, energia de colisão e potencial de saída de colisão foram 5 (V), 15 (eV) e 50 (V), respectivamente. Os dados foram adquiridos pelo software Analyst (1.4.1, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

A linearidade, que consiste nos limites de quantificação, determinada foi de 1.000 ng/mL a 1000.000 ng/mL. Uma regressão linear foi utilizada com um índice de ponderação de $1 / x^2$ foi aplicada às razões da área de pico de e padrão interno versus as concentrações dos padrões plasmáticos de capecitabina em duplicata para gerar uma curva de calibração. A regressão de peso foi empregada pois melhora a precisão na parte inferior da curva de concentração. O limite de detecção (LOD) e o limite inferior de quantificação (LOQ) foram determinados calculado como as concentrações com uma relação sinal / ruído de 3 e 10,

respectivamente. Cada padrão de concentração calculado de volta deveria atender ao seguinte critério aceitável: não superior a 20% de desvio.

A precisão dentro e entre corridas foi determinada como o coeficiente de variação,(CV) (%) = 100 (SD / M) e a precisão (%) por 100 (M / T), onde M é a média, SD é o desvio padrão de M, e T é a concentração teórica.

Para avaliar a estabilidade, amostras de plasma de controle de qualidade (3,0 e 800 ng / mL) foram submetidas a incubação a curto prazo (15 h) à temperatura ambiente; Quatro ciclos congelamentos / descongelamento (20°C); 119 h no auto-amostrador (6°C ± 2); e uma incubação de longo prazo (800 dias).

Posteriormente, as concentrações de capecitabina foram medidas e comparadas com amostras recém-preparadas.

Segue no quadro abaixo os parâmetros determinados no método bioanalítico.

Quadro 7. Sumário do método bioanalítico.

Código do estudo analítico	MGB-008/15
Centro analítico	MAGABI Pesq. Clín. Farm. Ltda.
Técnica analítica	LC-MS/MS
Método utilizado durante a quantificação	MPH086_01
Códigos dos equipamentos utilizados	MS01/SK01
Analito	Capecitabina
Padrão interno	Capecitabina-d11
Matriz biológica	Plasma humano
Anticoagulante	Heparina
Linearidade	1,000 ng/mL a 1000,000 ng/mL
Equação da curva	$y = a + bx (1/x)$
Limite Inferior de Quantificação (LIQ)	1,000 ng/mL
Controle de qualidade baixo (CQB)	3,000 ng/mL
Controle de qualidade intermediário (CQI)	150,000 ng/mL
Controle de qualidade médio (CQM)	400,000 ng/mL
Controle de qualidade alto (CQA)	800,000 ng/mL
Tempo de estabilidade de pós processamento	119 horas
Ciclos de congelamento e descongelamento	3 ciclos
Tempo de estabilidade de curta duração	15 horas
Tempo de estabilidade de longa duração	800 dias

3.5 Etapa Estatística

A análise dos parâmetros farmacocinéticos foi realizada usando modelo não compartimental em que a curva é ajustada aos dados sem obedecer a um modelo adequado para concentrações plasmáticas de capecitabina. Os parâmetros foram determinados diretamente dos valores de concentração reportados para cada tratamento.

Os parâmetros farmacocinéticos calculados foram: C_{max} , ASC_{0-t} , ASC_{0-inf} , T_{max} , $\%ASC_{Extrap}$, $T_{1/2}$ e K_{el} .

Métodos estatísticos utilizados neste estudo foram: Intervalo de Confiança Paramétrico, Análise de Variância (ANOVA) e Poder do Teste. O nível de confiança fixado para o intervalo foi de 90% e o poder mínimo desejável de 80%. O nível de significância fixado para os efeitos fixos da ANOVA foi de 5% para efeito de período e tratamento e de 10% para o efeito de sequência.

A bioequivalência entre as duas formulações e três sequências foi avaliada calculando a relação individual de teste/referência do C_{max} , a ASC da concentração plasmática até a última concentração observada acima do limite de quantificação (ASC_{0-t}), e a ASC entre a primeira coleta (pré-dose) e o infinito (ASC_{0-inf}). O método dos trapézoides, que consiste na soma da área dos trapézios formados pelas concentrações plasmáticas em relação ao tempo, foi utilizado para o cálculo da ASC e extrapolada para o cálculo da ASC_{0-inf} através de uma relação entre a última concentração obtida do fármaco e a sua constante de velocidade de eliminação (vide fórmula abaixo).

$$ASC[0-inf] = ASC[0-t] + Ct/Ke,$$

onde C_t é a última concentração quantificável.

A C_{max} foi analisada seguindo o método estatístico recomendado pela OMS. Para C_{max} , o desvio padrão intra-sujeito foi calculado para o produto de referência (SWR), que foi expresso pelo coeficiente de variação (CVWR). Se $CVWR < 30\%$ para C_{max} , em seguida, o intervalo de confiança de 90% para a proporção das médias geométricas do

parâmetro C_{max} tinha a faixa de aceitação de IC90% [80%, 125%]. Se CVWR de C_{max} fosse > 30%, então o intervalo de aceitação foi expandido com base na seguinte fórmula:

$$[L, U] = \exp [\pm k \cdot \text{SWR}]$$

Onde L é o limite inferior do intervalo de aceitação, U é o limite superior do intervalo de aceitação, k é a constante reguladora = 0,760 e o SWR é o desvio padrão intra-sujeito dos valores log-transformados do produto de referência C_{max} (comparador).

Se CVWR ≥ 50%, o limite máximo do intervalo de confiança permitido, ou seja, IC90% [69,84%, 143,19%], deveria ser adotado. Em qualquer caso, a média geométrica da relação C_{max} deveria estar contida na faixa [80,00%, 125,00%].

Os parâmetros farmacocinéticos log-transformados ASC_{0-t} e C_{max} foram analisados para determinar as diferenças entre produto teste e referência. Para ASC_{0-t}, a análise estatística foi conduzida baseada em médias de mínimos quadrados de cada componente do produto teste e referência. O modelo estatístico utilizado para a análise foi:

Sequência + Participante (Sequência) + Período + Administração.

A análise de variância (ANOVA), com efeitos fixos para sequência, período e administração e efeito aleatório para participante dentro da sequência foi conduzida usando transformação logarítmica de ASC_{0-t}. Foi calculado o intervalo de confiança de 90% para a razão das médias geométricas do parâmetro ASC_{0-t}. O critério de decisão foi de I.C. 90% [80%; 125%]. A bioequivalência deveria ser concluída se os intervalos de confiança obtidos estivessem dentro da faixa de 80-125% para C_{max}, ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} da capecitabina.

A porcentagem de ASC_{0-inf} que é extrapolada do Último para o infinito (%ASCExtrap) foi calculada com a seguinte fórmula:

$$(\text{ASC}_{0-\text{inf}} - \text{ASC}_{0-t}) / \text{ASC}_{0-\text{inf}} * 100$$

O K_e refere-se a constante de taxa de eliminação terminal e foi determinada por análise de regressão log-linear.

O Tempo de meia vida foi calculado a partir da seguinte fórmula: $T_{1/2} = \ln(2)/K_e$

O T_{max} refere-se ao tempo da concentração máxima.

Os parâmetros C_{max} , ASC_{0-t} , ASC_{0-inf} , T_{max} , $ASC\%_{extrap}$, $T_{1/2}$ e K_{el} , foram determinados utilizando o software *WinNonlin (Phoenix 6.4)*, Microsoft Excel 2010 e Graph Pad Prism. Version 3.02.

4 RESULTADOS

4.1 Análise descritiva

Receberam pelo menos uma das formulações do estudo 84 participantes que inicialmente satisfizeram os critérios de inclusão/exclusão. Um total de 77 participantes concluíram o estudo conforme ilustrado pela figura 11.

A idade dos participantes variou entre 18 e 53 anos (média 30,65). O peso e a altura ficaram compreendidos entre 55 e 99 kg (média = 74,42 kg) e 1,60 e 1,87 m (média=1,74m), respectivamente. O índice de massa corpórea (IMC) variou entre 19,20 e 29,41 (média = 24,42).

Os participantes não apresentaram nenhum quadro cardíaco, hepático, renal, pulmonar significativo doenças neurológicas, gastrointestinais e hematológicas, avaliadas pelo exame clínico, ECG e nenhuma alteração laboratorial dos exames realizados.

Sete participantes foram excluídos: cinco por abandono do estudo não relacionada ao tratamento: não comparecimento no dia da internação (participantes 2, 42, 50, 71 e 79); dois por critérios de exclusão, por apresentar evento adverso (participantes 73 e 80).

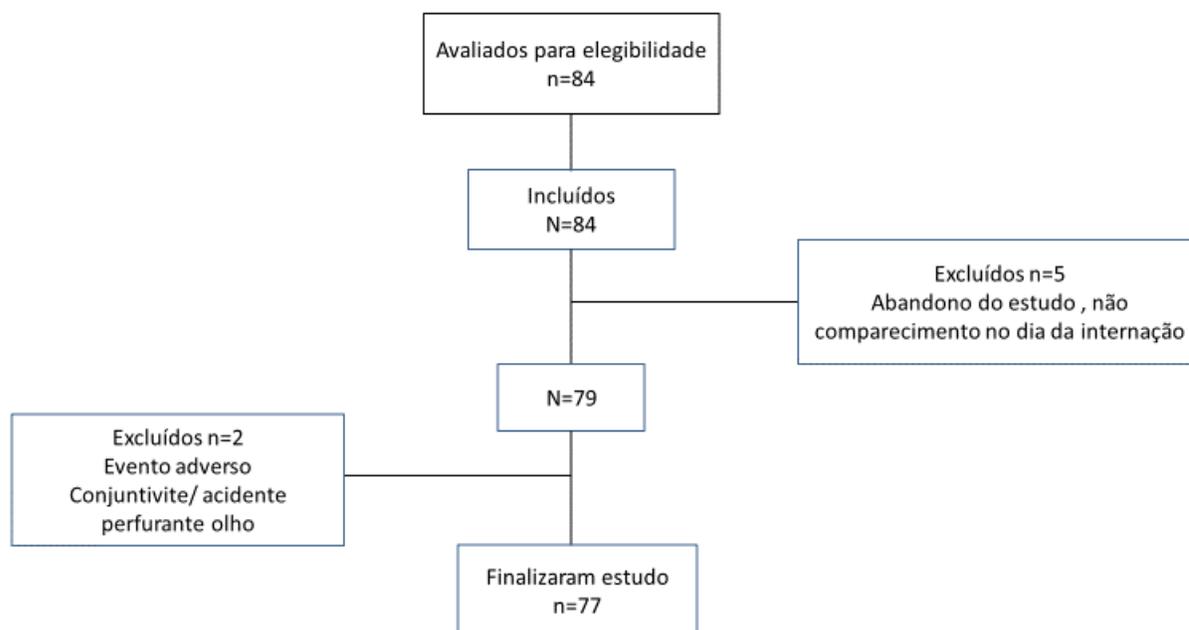


Figura 11. Fluxograma de participantes. Fonte: próprio autor.

4.2 Análise farmacocinética

Na análise farmacocinética realizada obtivemos os seguintes resultados:

Tabela 5. Descrição dos parâmetros farmacocinéticos avaliados após administração da capecitabina, produto teste e referência.

	Produto teste	Produto referência primeira administração	Produto referência segunda administração
C_{max} (ng/mL)	327,29	337,69	325,37
Meia vida (h)	0,41	0,53	0,42
T_{max} (h)	1,68	1,66	1,53
K_e (h⁻¹)	1,78	1,65	1,77
T_{último} (h)	4,47	4,59	4,49
C_{último} (ng/ml)	2,89	2,98	2,96
ASC_{último} (ng.h/mL)	288,83	283,15	278,49
ASC_{inf} (ng.h/ mL)	288,68	287,65	280,32
ASC_{0t}/ASC_{inf} (ng.h/ mL)	0,65	1,66	0,69

Variáveis expressas pelo cálculo da média.

As curvas das concentrações plasmáticas médias de capecitabina nos perfis de tempo de cada formulação são mostrados abaixo (Figura 12).

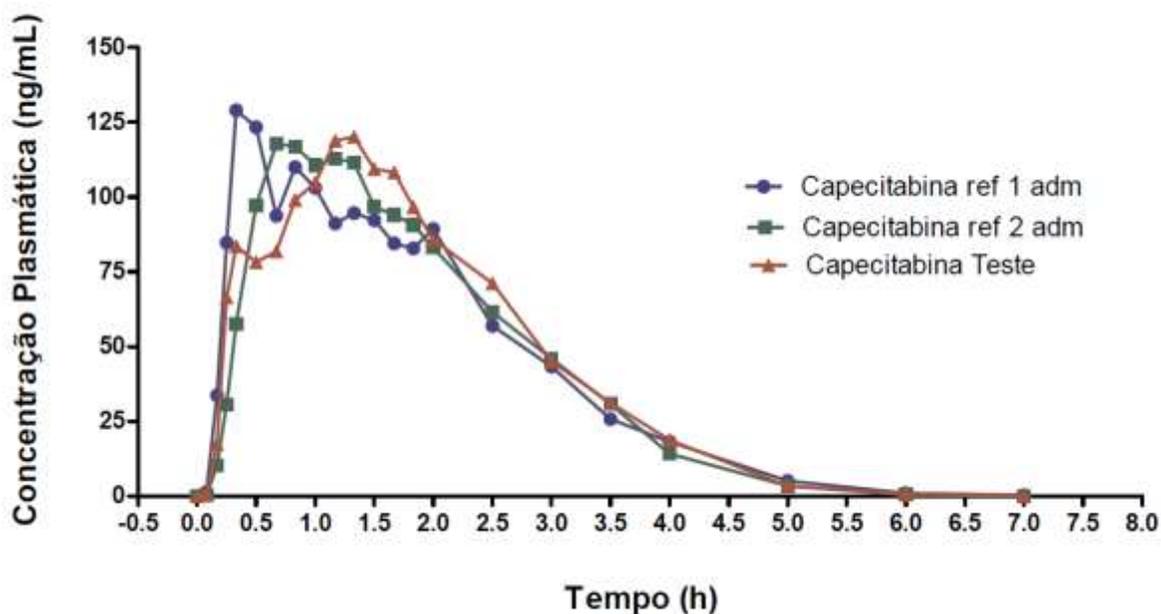


Figura 12. Concentração plasmática média por analito e tratamento. Capecitabina ref 1 adm: produto referência na primeira administração; capecitabina ref 2 adm: produto referência na segunda administração.

As médias geométricas dos três parâmetros para biodisponibilidade foram calculadas, como demonstrados na tabela abaixo (tabela 13). O intervalo utilizado para a para a aceitação da equivalência foi de 80 – 125% (dados transformados) para C_{max} e de 69.84% – 143.19% para ASC_{0-t} (dados transformados), visto que o coeficiente de variação CVWR foi $\geq 50\%$ (73.5767%).

Tabela 6. Resultados estatísticos por parâmetro farmacocinéticos.

	C_{max}	ASC_{0-t}	ASC_{0-inf}
Teste	5,590661	5,641772	5,634184
Referência	5,550704	5,599285	5,603979
I.C. 90% Teste vs. Referência	88,1322; 122,9057	98,7468; 110,2506	97,4852; 108,987

Resultados representados pelas médias geométricas. I.C. obtidos para a razão entre os tratamentos (dados transformados).

Comparando a biodisponibilidade entre produto teste e referência através da razão teste/referência (parâmetros C_{max} , ASC_{0-t} e ASC_{0-inf}) não houve diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7: Distribuição dos resultados finais apurados: biodisponibilidade comparativa média.

Parâmetro	N	Razão	Limite inferior	Limite superior	Poder
Cmax	77	104,0766	88,1322	122,9057	97,1439
ASC_{t0-último}	77	104,3403	98,7468	110,2506	99,9999
ASC_{0-inf}	73	103,0665	97,4852	108,9673	99,9998

Variáveis expressas em porcentagem.

As duas administrações do produto referência foram comparadas para avaliar variação inter e intra sujeito, não apresentando diferença estatisticamente significativa em relação a sequência, tratamento, período ou administração, como demonstrado na Tabela abaixo (tabela 8).

Tabela 8. Resultados avaliação inter, intra sujeito e variáveis.

	Cmax	ASC_{0-t}	ASC_{0-inf}
Coefficiente de variação (%) – primeira administração do referência vs. segunda			
Inter sujeito	28,150643	21,218575	20,650521
Intra sujeito	73,576704	20,14051	18,827717
P-valores obtidos para os efeitos fixos da ANOVA			
Sequência	0,43209	0,651765	0,749641
Tratamento	0,568284	0,160711	0,209378
Período	0,550855	0,765695	0,532941
Administração	0,943941	0,779682	0,864441

4.3 Análise tolerância e segurança

Vinte e um eventos adversos foram observados neste estudo clínico. Dezenove foram classificados como não relacionado ao tratamento. Dois casos de cefaléia leve foram considerados como possível relacionado ao tratamento.

Houve duas exclusões por evento adverso, um considerado grave, ambos não relacionados ao tratamento: um caso de conjuntivite e e um acidente perfurante. Houve uma lesão acidental de córnea do olho esquerdo do participante por queda de agulha com

seringa necessitando procedimento cirúrgico, com total recuperação. A lista de todos os eventos adversos encontra-se no anexo deste documento.

5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que o medicamento teste utilizado neste estudo foi bioequivalente à formulação já comercializada.

Sabe-se que o uso de participantes sadios é adequado para a maioria dos estudos de bioequivalência para extrapolar o resultados à outras populações, com exceção de quimioterapia devido aos riscos quanto a segurança, sendo neste caso preferível o uso de pacientes [47, 57]. Ainda, a participação de voluntários sadios e não pacientes apresenta uma maior facilidade de recrutamento. Dessa forma, a metodologia utilizada neste estudo foi inovadora em dois aspectos: o uso de participantes sadios e não pacientes se tratando de um medicamento oncológico; e pela utilização de três sequências de administração da medicação, com a referência sendo utilizada por duas vezes.

Um estudo piloto de bioequivalência foi realizado para avaliar a segurança da capecitabina em indivíduos sadios [56]. Foram utilizados 16 participantes divididos em dois grupos: um com administração da droga em jejum e outro após alimentação. Nesse estudo nenhum participante apresentou qualquer evento adverso e nenhuma alteração quanto a avaliação bioquímica e hematológica. Esses resultados são esperados pois a capecitabina é uma pró-droga. A conversão para 5-FU e seus metabólitos, que são os principais responsáveis pelos efeitos adversos, ocorre preferencialmente em células malignas. A conversão da capecitabina em 5-FU é quatro vezes maior em células tumorais do que em tecido sadio [58]. Foi observado que a toxicidade está mais relacionada aos catabólitos do 5-FU (5'-DFUR e alfa-fluoro-beta-alanina) [59], portanto o risco de toxicidade é pequeno com o uso de participantes sadios.

Cabe lembrar que a dose do estudo de 150mg é cerca de 25 a 30 vezes menor do que a dose diária empregada em pacientes com câncer. Ao longo desse estudo a dose total de capecitabina foi de 450mg: cerca de 150 vezes menor do que a dose prescrita a cada ciclo de tratamento. Sendo assim, a dose utilizada no estudo estava bem abaixo da utilizada em tratamento, fato que acrescenta a segurança aos participantes e é bem aceito pelas autoridades. De acordo com a nota técnica 05/2012 ANVISA [60], os pesquisadores tem autonomia para escolher quanto ao uso de participantes sadios ou pacientes, baseado no

potencial toxicológico do medicamento testado. No nosso estudo, tanto o produto teste como o referência foram bem tolerado após uma única dose oral.

Na literatura os estudos com capecitabina prévios ao estudo piloto citado anteriormente foram realizados unicamente com pacientes oncológicos. Cinco estudos prévios de bioequivalência da capecitabina foram identificados na literatura. Cassidy et al. (1999) [61] realizou um estudo aberto, randomizado, cruzado com uma única dose oral de 2000mg/m² de capecitabina. Foram utilizadas apenas duas sequências com 25 pacientes com tumores sólidos. O objetivo desse estudo foi baseado na biodisponibilidade do seu principal metabólito, 5'-DFUR. Parâmetros farmacocinéticos de capecitabina e seus outros metabólitos (5'-DFCR, 5-FU e FBAL) também foram avaliados. A biodisponibilidade foi considerada equivalente. Variáveis como idade, sexo, área da superfície corporal e depuração da creatinina não demonstraram efeito clinicamente significativo na farmacocinética da capecitabina ou seus metabólitos. No nosso estudo nenhum metabólito foi avaliado pois nossos participantes eram saudáveis, lembrando que a transformação em metabólito só é realizada significativamente quando há tecido tumoral [15, 24, 26, 27].

Outro estudo clínico, multicêntrico, aberto, randomizado, cruzado com dose única também avaliou bioequivalência da capecitabina pelos seus parâmetros farmacocinéticos e de 5'-DFCR [17]. A dose utilizada foi 2000mg/m², com apenas duas sequências com 63 pacientes com câncer de mama, cólon e colorretal, demonstrando bioequivalência entre as fórmulas. Mais uma vez se tratava de pacientes, em que a dosagem de metabólitos se torna interessante em termos de conhecimento mas não é mais aceita pelas autoridades regulatórias [62]. Queckenberg et al. (2015) utilizou dosagem plasmática capecitabina e seus metabólitos 5'-DFUR, 5'-DFCR e 5-FU [24] em estudo aberto, multicêntrico, randomizado, cruzado com 46 pacientes com câncer. Foram duas sequências, cada paciente recebendo sua dose específica de capecitabina de acordo com seu tratamento prévio ao estudo, a média foi de 1739mg. Nesse estudo a formulação teste não apresentou bioequivalência. Gadiko et al. demonstrou bioequivalência com 103 pacientes em estudo cruzado, de dois períodos e duas sequências, com uma única administração de dose fixa (quatro comprimidos / 2000 mg) [63].

No estudo de Chaigneau et al. (2008) o objetivo da bioequivalência da capecitabina era completamente diferente dos outros estudos: foi avaliar a possibilidade de facilitar a administração em pacientes com disfagia consequente de câncer (esôfago, estreitamento por radioterapia, etc) [64]. Uma mesma formulação porém comprimido esmagado vs comprimido inteiro em 14 pacientes em um estudo monocêntrico, randomizado, cruzado, 2 braços com a administração de $1250\text{mg}/\text{m}^2$ 2x ao dia. A biodisponibilidade não se demonstrou equivalente.

Os autores desses estudos justificam o uso de pacientes e não indivíduos sadios devido a citotoxicidade da droga. Vale lembrar que a capecitabina é uma pró-droga, ela se torna citotóxica somente no momento que é transformada em 5-FU e outros metabólitos e esse fenômeno é somente possível em tecido tumoral. O uso de participantes sadios para estudos de capecitabina é seguro, facilita recrutamento, reduz o custo do estudo. Além disso, não compromete o tratamento do paciente oncológico. Mesmo se não houver bioequivalência, não há prejuízo aos participantes, visto que a capecitabina não está sendo empregada como intuito terapêutico.

Outro ponto inovador foi utilizar três sequências com a administração do produto referência duas vezes em um estudo de quimioterapia oral. Estudos de bioequivalência utilizam duas sequências. Foi decidido utilizar três sequências visando a avaliação da variabilidade intraindividual mais detalhada. Medicamentos com alta variabilidade são aqueles que apresentam importante variabilidade de resposta intraindividual dificultando demonstração da bioequivalência entre o produto genérico e o produto de referência em um estudo cruzado com somente duas sequências, necessitando até mesmo de uma população maior [43, 65]. Utilizando o produto referência como avaliador da variabilidade intra-individual, teríamos a possibilidade de alteração no intervalo de confiança [43, 66]. A Agência Europeia de Medicamento (EMA) aconselha a administração do produto referência por pelo menos duas vezes para determinar a variabilidade, e assim adaptar intervalos se necessário. Se essa variabilidade intra-individual se apresentar até 30% o intervalo permanece inalterado, de 80 a 125. Acima de 30 até 35% será adotado 77,23 a 129,48; até 40% de 74,62 a 134,02; acima desse valor até 45% será de 72,15 a 138,59; se igual ou maior que 50% o intervalo será um pouco mais abrangente, de 69,84 a 143,19 [43, 66, 67]. Em um estudo com antidepressivo foi utilizado quatro sequências podendo assim identificar

importante variabilidade inter e intraindividuo [65]. Reavaliando estudos da capecitabina, Cassidy et al.(1999) [61] assim que Gadiko et al. (2012) [63] encontraram uma variabilidade intra-individual importante da capecitabina em C_{max} , com coeficiente de variação maior que 50%. Para Chachad et al. (2013) [17] foi 39,6%. No nosso estudo avaliamos variação inter e intra sujeitos além de fatores como sequência, tratamento, período e administração não demonstrando nenhuma diferença estatisticamente significativa e, portanto, a bioequivalência foi avaliada dentro do intervalo pré estabelecido. O intervalo confiança de 90% de C_{max} , ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} entre teste e referência foi obtido dentro da faixa de bioequivalência convencional de 80-125%.

Comparando com a literatura podemos afirmar que uma das limitações deste estudo foi ter feito somente a dosagem plasmática da capecitabina; nenhum de seus metabólitos foi avaliado. Por esse estudo ter tido um objetivo principal regulatório e metabólitos não são mais aceitos como parâmetro para bioequivalência da capecitabina, essa avaliação não foi considerada. Além disso, 5'DFUR e 5-FU provavelmente não seriam detectados pois necessitam de CDA e TP, respectivamente, e essas enzimas são encontradas em tecido tumoral [15, 24, 26, 27]. Talvez a dosagem desses metabólitos poderia estar contido nesse estudo como forma de reafirmar a segurança dos participantes, uma vez que são eles os responsáveis pela ação citotóxica da droga e efeitos colaterais [24, 26].

6 CONCLUSÃO

A formulação de capecitabina testada (comprimido de 150 mg, Eurofarma Laboratórios S.A.) foi bioequivalente à formulação referência, Xeloda® (comprimido de 150 mg, Roche Químicos e Farmacêuticos S.A.) tanto para a taxa quanto para a extensão e velocidade da absorção.

A avaliação da variabilidade intraindividual, através da comparação dos parâmetros farmacocinéticos da capecitabina referência administrada por duas sequências não demonstrou nenhuma diferença estatisticamente significativa.

O uso de capecitabina 150mg em dose única por participantes saudáveis, em 3 períodos com *wash out* de 7 dias foi seguro e bem tolerado, sem nenhum evento adverso sério relacionado ao medicamento.

7 REFERÊNCIAS

1. Oliveira M, Malta D, Guauche H, *et al.* Estimativa de pessoas com diagnóstico de câncer no Brasil: dados da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. *Revista Brasileira Epidemiologia.* 2015; 18(2):146-157.
2. Torre LA, Bray F, Siegel RL, *et al.* Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.* 2015; 65(2):87-108.
3. World Health Organization. Cancer Fact Sheet. 2018. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 15/03/2018.
4. Medici AC. Custos do Tratamento do Câncer no Brasil: Como Melhorar o Foco. *Blog Monitor de Saude.* 2018; 88:1-5.
5. World Health Organization. World Cancer Report. 2014. Disponível em: <http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports>. Acesso em: 14/10/2017.
6. INCA. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. 2018. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>. Acessado em 09/07/2018.
7. Favoriti P, Carbone G, Greco M, *et al.* Worldwide burden of colorectal cancer: a review. *Updates in Surgery.* 2016; 68(1):7-11.
8. de Almeida VL, Leitão A, Reina LCB, *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova.* 2005; 28 (1):118-29.
9. DeVita VT, Chu E. A History of Cancer Chemotherapy. *Cancer Research.* 2008; 68 (21):8643-53.
10. INCA. Quimioterapia. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101#. Acesso em: 10/09/2017.
11. Leicher L, Graff J, Coers W, *et al.* Tolerability of Capecitabine Monotherapy in Metastatic Colorectal Cancer: A Real-World Study. *Drugs in R&D.* 2017; 17:117-24.
12. Esin E, Telli TA, Yuce D, *et al.* A correlation study of fluorouracil pharmacodynamics with clinical efficacy and toxicity. *Tumori Journal.* 2017; 8:0.
13. Dean L. Capecitabine Therapy and *DPYD* Genotype. 2016 Sep 15. In: Pratt V, McLeod H, Dean L, *et al.*, editors. *Medical Genetics Summaries* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012-.

14. FDA. Xeloda® (capecitabine). 2001. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2001/20896S6lbl.pdf. Acesso em: 14/09/2017.
15. Farkouh A, Scheithauer W, Buchner P, *et al.* Clinical Pharmacokinetics of Capecitabine and its Metabolites in Combination with the Monoclonal Antibody Bevacizumab. *Anticancer research*. 2014; 34:3669-74.
16. Ter Veer E, Ngai LL, Valkenhoef GV, *et al.* Capecitabine, 5-fluorouracil and S-1 based regimens for previously untreated advanced oesophagogastric cancer: A network meta-analysis. *Scientific Reports*. 2017; 7(1):7142.
17. Chachad S, Purandare S, Malhotra G. Comparison of pharmacokinetics and safety profiles of two capecitabine tablet formulations in patients with colon, colorectal or breast cancer. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*. 2013; 71(2):287-92.
18. Zujewski JA, Rubinstein L. CREATE-X a role for capecitabine in early-stage breast cancer: an analysis of available data. *NPJ Breast Cancer*. 2017; 20(3):27.
19. Zhang ZC, Xu QN, Lin SL, *et al.* Capecitabine in Combination with Standard (Neo)Adjuvant Regimens in Early Breast Cancer: Survival Outcome from a Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PLoS One*. 2016;11(10):e0164663.
20. Iqbal H, Pan Q. Capecitabine for treating head and neck cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2016; 25(7):851-9.
21. Kim TY, Oh DY, Bang YJ. Capecitabine for the treatment of gastric cancer. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology*. 2015; 9(12):1471-81.
22. Chen Q, Meng F, Wang L, *et al.* A polymorphism in ABCG4 is related to efficacy of 5-FU/capecitabine-based chemotherapy in colorectal cancer patients. *Scientific Reports*. 2017; 7(1):1-7.
23. Bertholee D, Maring JG, Kuilenburg A. Genotypes Affecting the Pharmacokinetics of Anticancer Drugs. *Clinical Pharmacokinetics*. 2017; 56:317-37.
24. Queckenberg C, Erlinghagen V, Baken BC. Pharmacokinetics and pharmacogenetics of capecitabine and its metabolites following replicate administration of two 500 mg tablet formulations. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*. 2015; 76(5):1081-91.
25. Lam SW, Guchelaar HJ, Boven E. The role of pharmacogenetics in capecitabine efficacy and toxicity. *Cancer Treatment Reviews*. 2016; 50:9-22.
26. Thorn CF, Marsh S, Carrillo MW, *et al.* PharmGKB summary: fluoropyrimidine pathways. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2011; 21(4):237-42.

27. Miura K, Kinouchi M, Ishida K, *et al.* 5-FU Metabolism in Cancer and Orally Administrable 5-FU Drugs. *Cancers*. 2010; 2:1717-30.
28. Honda J, Sasa M, Moriya T, *et al.* Thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase are predictive factors of therapeutic efficacy of capecitabine monotherapy for breast cancer-preliminary results. *The Journal of Medical Investigation*. 2008; 55(1-2):54-60.
29. Pandolfo M, Araújo R, Nascimento L, *et al.* Farmacogenoma do fluorouracil. Análise de polimorfismo no gene da diidropirimidina desidrogenase. *Infarma*. 2005; 17 (3/4):62-4.
30. Reigner B, Blesch K, Weidekamm E. Clinical pharmacokinetics of capecitabine. *Clinical Pharmacokinetics*. 2001;40(2):85-104.
31. Walko CM, Lindley C. Capecitabine: a review. *Clinical Therapeutics*. 2005; 27(1):23-44.
32. ANVISA. Xeloda. Disponível em:
www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao....
Acesso em: 14/09/2017.
33. Inokuchi M, Ishikawa S, Furukawa H, *et al.* Treatment of capecitabine-induced hand-foot syndrome using a topical retinoid: A case report. *Oncology Letters*. 2014;7(2):444-8.
34. ANVISA. Manual de boas práticas em biodisponibilidade: bioequivalência. Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/2819984/Manual+de+Boas+Pr%C3%A1ticas+em+Biodisponibilidade+e+Bioequival%C3%Aancia+Volume+1/c77ef1eb-bc83-4a7a-ae8b-3d2ef042aa61>. Acesso em: 14/09/2017.
35. Hill AM, Barber MJ, Gotham D. Estimated costs of production and potential prices for the WHO Essential Medicines List. *BMJ Global Health*. 2018;3(1):1-7.
36. Jones GH, Carrier MA, Silver RT, *et al.* Strategies that delay or prevent the timely availability of affordable generic drugs in the United States. *Blood*. 2016; 127(11):1398-402.
37. van der Meersch A, Dechartres A, Ravaud P. Quality of reporting of bioequivalence trials comparing generic to brand name drugs: a methodological systematic review. *PLoS One*. 2011; 6(8):1-7.
38. Gota VS, Patial P. Toward better quality of anticancer generics in India. *Indian Journal of Cancer*. 2014; 51 (3): 366-8.

39. Nishijima M, Biasoto GJ, Lagroteria E. A competição no mercado farmacêutico brasileiro após uma década de medicamentos genéricos: uma análise de rivalidade em um mercado regulado. *Economia e Sociedade*. 2014; 23(50):55-186.
40. Vieira FS, Zucchi P. Diferenças de preços entre medicamentos genéricos e de referência no Brasil. *Revista Saúde Pública*. 2006; 40(3):444-9.
41. FDA. Guidance for Industry Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products — General Considerations U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) March 2003 BP Revision 1. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm154838>. Acesso em: 14/09/2017.
42. Morais JA, Lobato MR. The new European Medicines Agency guideline on the investigation of bioequivalence. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 2010; 106(3):221-5.
43. Davit B, Braddy AC, Conner DP, *et al.* International guidelines for bioequivalence of systemically available orally administered generic drug products: a survey of similarities and differences. *AAPS Journal*. 2013; 15(4):974-90.
44. Toverud EL, Hartmann K, Håkonsen H. A Systematic Review of Physicians' and Pharmacists' Perspectives on Generic Drug Use: What are the Global Challenges? *Applied Health Economics and Health Policy*. 2015; 13(1):S35-45.
45. Galgatte UC, Jamdade VR, Aute PP, *et al.* Study on requirements of bioequivalence for registration of pharmaceutical products in USA, Europe and Canada. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2014; 22(5):391-402.
46. Reigner B, Verweij J, Dirix L, *et al.* Effect of food on the pharmacokinetics of capecitabine and its metabolites following oral administration in cancer patients. *Clinical Cancer Research*. 1998; 4(4):941-8.
47. García-Arieta A, Gordon J. Bioequivalence requirements in the European Union: critical discussion. *AAPS Journal*. 2012; 14(4):738-48.
48. ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE. GUIDELINE FOR GOOD CLINICAL PRACTICE. E6(R1). Disponível em: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Efficacy/E6/E6_R1_Guideline.pdf. Acesso em: 11/08/2015.
49. OMS. Boas Práticas Clínicas: Documento das Américas IV Conferência Pan-Americana para harmonização da regulamentação farmacêutica. Disponível em: http://hrac.usp.br/wpcontent/uploads/2016/04/documento_americas_organizacao_anam_.pdf. Acesso em: 03/04/2015.

50. Adaway JE, Keevil BG, Owen LJ. Liquid chromatography tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. *Annals of Clinical Biochemistry*. 2015; 52(1):18-38.
51. Dayyih WA, Hamad M, Awwad AA, *et al.* A Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Evaluation of Two Brands of Enalapril 20 mg Tablets in Healthy Human Volunteers. *Journal analytical methods chemistry*. 2017; 08: 1-8.
52. Peng JB, Luo CH, Wang YC, *et al.* Validation of a liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry method for determination of all-trans retinoic acid in human plasma and its application to a bioequivalence study. *Molecules*. 2014; 19(1):1189-200.
53. Shah JV, Parekh JM, Shah PA, *et al.* Application of an LC-MS/MS method for the analysis of amlodipine, valsartan and hydrochlorothiazide in polypill for a bioequivalence study. *Journal of pharmaceutical analysis*. 2017; 7(5):309-16.
54. Pitt J. Principles and Applications of Liquid Chromatography- Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *Clinical Biochemistry Review*. 2009; 30: 19-34.
55. Lanças F. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? *Scientia Chromatographica*. 2009; 1 (2): 35-61.
56. Mendes GD, Babadopulos T, Chen LS, *et al.* The use of Healthy Volunteers to Evaluate Bioequivalence of Anti-neoplastic Drugs: Pilot Studies with Capecitabine. *Journal of bioequivalence & bioavailability*. 2011; S1: 1-8.
57. Kaur P, Chaurasia CS, Davit BM, *et al.* Bioequivalence study designs for generic solid oral anticancer drug products: scientific and regulatory considerations. *Journal of Clinical Pharmacology*. 2013; 53(12):1252-60.
58. Schüller J, Cassidy J, Dumont E, *et al.* Preferential activation of capecitabine in tumor following oral administration to colorectal cancer patients. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*. 2000; 45(4):291-7.
59. Gieschke R, Reigner B, Blesch KS, *et al.* Population pharmacokinetic analysis of the major metabolites of capecitabine. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamic*. 2002; 29(1):25-47.
60. ANVISA. Resolução Nº 466. 2012. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2013/res0466_12_12_2012.html. Acesso em: 14/09/2017.
61. Cassidy J, Twelves C, Cameron D, *et al.* Bioequivalence of two tablet formulations of capecitabine and exploration of age, gender, body surface area, and creatinine clearance as factors influencing systemic exposure in cancer patients. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*. 1999; 44(6):453-60.

62. European Medicines Agency/CHMP. Guideline on the investigation of bioequivalence (CPMP/QWP/EWP/1401/98 Rev. 1). 2010. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf. Acesso em: 11/03/2018.
63. Gadiko C, Tippabhotla SK, Thota S, *et al.* Comparative bioavailability study of capecitabine tablets of 500 mg in metastatic breast cancer and colorectal cancer patients under fed condition. *Clinical research and regulatory affairs*. 2012; 29:72-76.
64. Chaigneau L, Royer B, Montange D, *et al.* Influence of capecitabine absorption on its metabolites pharmacokinetics: a bioequivalence study. *Annals of Oncology*. 2008; 19(11):1980-1.
65. Li C, Xu J, Zheng Y, *et al.* Bioequivalence and Pharmacokinetic Profiles of Agomelatine 25-mg Tablets in Healthy Chinese Subjects: A Four-Way Replicate Crossover Study Demonstrating High Intra- and Inter-Individual Variations. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2017; 65(6):524-29.
66. Van Peer A. Variability and impact on design of bioequivalence studies. *Basic Clinical Pharmacology and Toxicology*. 2010;106(3):146-53.
67. Davit BM, Chen ML, Conner DP, *et al.* Implementation of a reference-scaled average bioequivalence approach for highly variable generic drug products by the US Food and Drug Administration. *AAPS Journal*. 2012; 14(4):915-24.

8 ANEXOS

Eventos adversos do estudo.

Participante	Período	Evento	Desfecho
03	29.05.15 Pré int P2	Resfriado, uso de Naldecon, 1 dose. Evento não sério, leve, não relacionado.	29.05.15; total recuperação
07	28.05.15 Pré int P2	Cefaléia, uso de Dorflex, 1 dose. Evento não sério, leve, não relacionado.	28.05.15; total recuperação
08	28.05.15 Pré int P2	Hipertrigliceridemia (259 mg/dL). Evento não sério, moderado, não relacionado.	02.06.15; total recuperação.
13	04.06.15 Pré int P3	Cefaléia, uso de Neosaldina, 1 dose. Evento não sério, fraco, não relacionado.	04.06.15; total recuperação.
16	26.05.15 Intervalo P1/P2	Cefaléia, uso de Dipirona, 1 dose 500mg. Evento não sério, leve, não relacionado.	26.05.15; total recuperação.
19	26.05.15 Intervalo P1/P2	Conjuntivite, uso de Diclofenaco resinato 3 doses de 30 mg (8h/8h) e trametamol cetorolaco tópica 8/8h por dois dias. Evento não sério, leve, não relacionado.	27.05.15; total recuperação.
31	17.06.15 Pós P1	Hipertrigliceridemia (362mg/dL). Evento não sério, moderado, não relacionado.	24.06.14; total recuperação
31	20.06.15 Pré int P2	Resfriado, uso de Cimegripe, 1 dose. Evento não sério, leve, não relacionado.	20.06.15; total recuperação.
31	01.07.15 Pós-estudo	Hipertrigliceridemia (287 mg/dL). Evento não sério, moderado, não relacionado.	Resolução total em 30 dias.
33	03.06.15 Pós P1	Hipertrigliceridemia (295 mg/dL). Evento não sério, moderado, não relacionado.	10.06.15, total recuperação.
38	09.06.15 Intervalo P2/P3	Resfriado, uso de resfenol, 1 comprimido. Evento não sério, leve, não relacionado.	10.06.15, total recuperação.

Participante	Período	Evento	Desfecho
57	16.06.15 Intervalo P1/P2	Hipertrigliceridemia (261 mg/dL). Evento não sério, leve, não relacionado.	01.07.15, total recuperação
57	28.06.15 P3	Cefaléia. Evento não sério, leve, possível relação. Tratamento: Paracetamol 750 mg VO.	28.06.15; total recuperação
66	15.06.15 Intervalo P1/P2	Dor muscular após prática de atividade física, uso de Nimesulida 100 mg. Evento não sério, leve, não relacionado a terapia.	15.06.15 total recuperação.
70	22.06.15 Intervalo P2/P3	Cefaléia, uso de Nimesulida 100mg. Evento não sério, leve, não relacionado.	22.06.15; total recuperação.
72	28.06.15 P3	Cefaléia. Evento não sério, leve, possível relação com terapia. Tratamento: Paracetamol 750mg VO.	28.06.15, total recuperação.
73	14.07.15 Pós-estudo	Hipertrigliceridemia (301 mg/dL). Evento não sério, moderado, não relacionado.	Resolução total em 30 dias.
77	17.06.15 Intervalo P1/P2	Hipertrigliceridemia (280 mg/dL). Evento não sério, leve, não relacionado com a terapia.	01.07.15, total recuperação.
80	20.06.15 Pré P2	Conjuntivite bilateral. Evento não sério, moderado, não relacionado. Avaliação oftalmologista, higiene local com soro fisiológico.	Excluído do estudo. 25.06.15 total recuperação
73	14.06.15 P1	Lesão acidental córnea de olho esquerdo por perfurante (queda de agulha). Não esperado, intenso, nenhuma relação. Procedimento Imediato: sedação, procedimento cirúrgico (sutura corneana). Posteriormente: cirurgia de catarata pós traumática.	Excluído do estudo 08/10/2015 –Boa evolução. Visão 100% olho perfurado uso de lente de contato rígida.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: GDN 016/14 - Estudo de biodisponibilidade comparativa semi-replicado, três sequências, três períodos, de uma formulação teste (Capecitabina - comprimido - 150 mg; Eurofarma Laboratórios S.A.) versus uma Formulação de Referência (Xeloda [Capecitabina]- comprimido - 150 mg; Roche Químicos e Farmacêuticos S.A.) em voluntários sadios do sexo masculino após alimentação

Pesquisador: GILBERTO DE NUCCI

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 41815815.4.0000.5599

Instituição Proponente: Galeno Desenvolvimento de Pesquisas Ltda

Patrocinador Principal: Eurofarma Laboratórios S/A

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 969.185

Data da Relatoria: 25/02/2015

Apresentação do Projeto:

Versão: Final-Data do Protocolo: 16/Jan/2015

Status Aprovada

Protocolo número 016/14

A capecitabina, uma pró-droga do 5-fluorouracil (5-FU) que tem administração por via oral. A capecitabina é um agente citotóxico que pertence ao grupo dos antimetabolitos. A capecitabina é um “pró-fármaco” que é convertido em 5-fluorouracilo (5-FU) no organismo. Esta conversão é superior nas células tumorais em relação à conversão nos tecidos normais. O medicamento é tomado na forma de comprimidos, enquanto o 5-FU necessita, habitualmente, de ser injetado.

Indicações:

Câncer de mama metastático ou localmente avançado: Em combinação com docetaxel após falha de regime que incluía antraciclina ou em monoterapia após falha de taxane

Endereço: Av. Dr. Romeu Tórtima, 739

Bairro: JARDIM SANTA GENEVRA II (BARAO

UF: SP

Município: CAMPINAS

CEP: 13.084-791

Telefone: (19)3517-6830

E-mail: cep_investiga@grupoinvestiga.com.br

Continuação do Parecer: 969.185

e de regime contendo antraciclina.

Câncer colorretal: Em monoterapia no tratamento adjuvante de pacientes com câncer colorretal Dukes' C (estágio III), submetidos à ressecção completa do tumor primário ou no tratamento de primeira linha de pacientes com carcinoma colorretal metastático.

Estudo aberto, aleatorizado, cruzado, semi-replicado, com 2 administrações, 3 períodos (3 sequências), nos quais os participantes recebem, em cada período distinto, a formulação teste (1 ocasião) ou a formulação referência (em 2 ocasiões), após a ingestão de alimentação padronizada, havendo por conseguinte 3 braços de administrações.

Produtos sob investigação, dose, e via de administração:

Teste: Capecitabina - comprimido - 150 mg; Eurofarma Laboratórios S.A.– administrado em dose única por via oral

Referência do produto, dose, e via de administração:

Referência: Xeloda [Capecitabina] - comprimido - 150 mg; Roche Químicos e Farmacêuticos S.A., administrado em dose única por via oral

As formulações são administradas em dose única por via oral seguidas de coletas de sangue de pelo menos 3 meias-vidas. Considerando-se também os aspectos de segurança, planeja-se um intervalo mínimo de 7 dias entre as internações.

Os participantes serão aleatoriamente designados a uma das seguintes sequências de administrações.

COMENTÁRIOS CEP:

Por se tratar de uma droga com ação citotóxica, usada no tratamento de câncer, existem algumas exigências que devem ser seguidas.

O uso de voluntários sadios segue as recomendações da Nota Técnica 05/2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Segundo Nota: O estudo deve ser realizado:

Endereço: Av. Dr. Romeu Tórtima, 739

Bairro: JARDIM SANTA GENEVRA II (BARAO

CEP: 13.084-791

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3517-6830

E-mail: cep_investiga@grupoinvestiga.com.br

Continuação do Parecer: 969.185

-População do estudo:

Voluntários do sexo masculino

Voluntários do sexo feminino com esterilização definitiva

-Dose oral 150mg

Um estudo piloto foi realizado com a medicação na mesma dose diária, esta foi bem tolerada pelos participantes, sem evidências de reações adversas.

Objetivo da Pesquisa:

-Este estudo tem por objetivo avaliar comparativamente a biodisponibilidade de 2 produtos (teste e referência) a fim de determinar se são bioequivalentes.

A biodisponibilidade comparativa do princípio ativo das formulações administradas por via oral após alimentação será avaliada com base em comparações estatísticas de parâmetros farmacocinéticos relevantes para os fármacos, obtidas das amostras de sangue a serem coletadas. As concentrações serão medidas através de método analítico apropriado e validado.

- Avaliação de segurança e tolerabilidade

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Do projeto e TCLE:

RISCOS:

A administração por boca de capecitabina de maneira continuada para tratamento do câncer, com doses cerca de 150 vezes superior pode causar reações como: diarreia, náusea [vontade de vomitar], vômito, dor abdominal [dor na barriga] e estomatite [inflamação na boca]. Também pode nestes pacientes ocorrer o que é denominado de “síndrome mão-pé”, caracterizada por dormência, enfraquecimento, alteração na sensibilidade, inchaço ou vermelhidão, com ou sem dor, ou ainda descamação, aparecimento de vesículas nas mãos e pés.

Também foram descritos sintomas como dor de cabeça, tontura, alteração no paladar, cansaço, febre. Nestas doses também há informação de que a droga pode ser tóxica para o coração, provocando dor, alterações do ritmo e em alguns casos parades cardíaca. Pode também haver diminuição de células do sangue como linfócitos e plaquetas ou aumento dos níveis de triglicerídios e bilirrubina.

Endereço: Av. Dr. Romeu Tórtima, 739

Bairro: JARDIM SANTA GENEVRA II (BARAO

CEP: 13.084-791

UF: SP **Município:** CAMPINAS

Telefone: (19)3517-6830

E-mail: cep_investiga@grupoinvestiga.com.br

Continuação do Parecer: 969.185

A dose a ser empregada de 150 mg por período, nesse estudo, é cerca de 25 a 30 vezes menor que a dose diária empregada em pacientes com câncer. A dose total do estudo (450 mg) é cerca de 150 vezes menor que aquela prescrita para cada ciclo de tratamento. Acrescente-se o fato de que a capecitabina vem a ser uma pró-droga cuja conversão para 5-fluoracil ocorre preferencialmente em células malignas, o que reduz ainda mais o potencial de efeito tóxico eventualmente existente quando da exposição ao 5-fluoracil.

A retirada de sangue é um procedimento seguro e pode causar um leve desconforto, além de uma mancha roxa pequena no local da picada que frequentemente resolve sem maiores problemas.

BENEFÍCIOS:

Em estudo piloto realizado com a medicação na mesma dose diária, esta foi bem tolerada pelos participantes, sem evidências de reações adversas.

O participante realizará exames pré e pós estudo que lhe darão informações sobre seu estado de saúde atual. Espera-se que esse estudo contribuia para disponibilizar uma nova opção de produto farmacêutico para a população em geral.

O uso de voluntários sadios segue as recomendações da Nota Técnica 05/2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O protocolo de pesquisa foi bem elaborado com bibliografia pertinente. Com relação aos Aspectos Éticos, a pesquisa segue as normas da Resolução CNS nº 466/2012. A metodologia é adequada aos objetivos apresentados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos apresentados:

- Folha de Rosto preenchida e assinada;
- Declarações do Pesquisador e Patrocinador quanto ao cumprimento dos termos da Resolução CNS nº 466/2012;
- Descrição Fármaco;
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE-Protocolo Clínico no 016/14 - Versão Final de 16/Jan/2015), com linguagem acessível à compreensão dos participantes da pesquisa contendo as

Endereço: Av. Dr. Romeu Tórtima, 739

Bairro: JARDIM SANTA GENEVRA II (BARAO

CEP: 13.084-791

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3517-6830

E-mail: cep_investiga@grupoinvestiga.com.br

Continuação do Parecer: 969.185

informações necessárias: justificativa, objetivos e procedimentos da pesquisa, desconfortos, riscos e benefícios esperados, liberdade do participante em se recusar a participar ou retirar seu consentimento a qualquer momento sem penalização, garantia de sigilo, formas de ressarcimento e indenização.

- Apólice de Seguro;
- Termo de Recrutamento (Anexo IV do Protocolo Clínico no 016/14 - Versão Final de 16/Jan/2015);
- Apólice de Seguro;
- POP para coleta, armazenamento e descarte material biológico (PEC PRO 10v09);
- Orçamento e Cronograma detalhado.

Recomendações:

Em atendimento à Resolução CNS nº 466/2012, deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer intercorrência ou a sua interrupção.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisa apresenta metodologia adequada aos objetivos propostos, descreve os critérios de inclusão e exclusão necessários para o desenvolvimento da mesma, e apresenta todas as orientações para que o participante da pesquisa possa colaborar com o bom andamento do estudo.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Dr. Romeu Tórtima, 739

Bairro: JARDIM SANTA GENEBRA II (BARAO

CEP: 13.084-791

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3517-6830

E-mail: cep_investiga@grupoinvestiga.com.br



INVESTIGA - INSTITUTOS DE
PESQUISA



Continuação do Parecer: 969.185

CAMPINAS, 02 de Março de 2015

Assinado por:
Cristiana Madjarof
(Coordenador)

Endereço: Av. Dr. Romeu Tórtima, 739

Bairro: JARDIM SANTA GENEVRA II (BARAO

CEP: 13.084-791

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3517-6830

E-mail: cep_investiga@grupoinvestiga.com.br

Subject: AW: Permission to use published article

From: joerg.feistle@dustri.de

To: marianammts@yahoo.com

Date: Friday, September 21, 2018, 3:36:36 AM GMT-3

Dear Doctor Mariana Machado Matos,

Dustri-Verlag grants permission to re-use material included in the following article published in *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* for inclusion in your Ms.C. dissertation (academic use only):

Matos MM, Bosio-Guimarães RA, Schmidt Niederauer AJ, Pastre KIF, Moreno RA, Schramm SG, Galvinas PAR, Mendes GD, De Nucci G. Comparative bioavailability study with two capecitabine tablet formulations administered with food in healthy subjects.. 2018 Aug 14. doi: 10.5414/CP203239.

We request to give full credit to the author and publisher as a reference.

Sincerely yours,

Joerg Feistle

Dustri-Verlag, Inc.

P.O. Box 561205

Rockledge, FL 32956-1205

Phone (321)594-4340

Fax (321)414-0219

Email Joerg.Feistle@dustri.com

<http://www.dustri.com>, <http://www.clinnephrol.com>, <http://www.clinpharmacol.com>

article submission: www.dustri-manus.com

Von: mariana mts [mailto:marianammts@yahoo.com]
Gesendet: Donnerstag, 20. September 2018 19:19
An: woodcock@clinpharmacol.com
Cc: info@dustri.com
Betreff: Permission to use published article

Campinas, 9/20/2018

Dustri-Verlag

Prof. B.G. Woodcock

We are writing to you in order to obtain a permission to re-use material included in the following article published in International Journal Clinical Pharmacology Therapeutics for inclusion in my Ms.C. dissertation:

Matos MM, Bosio-Guimarães RA, Schmidt Niederauer AJ, Pastre KIF, Moreno RA, Schramm SG, Galvinas PAR, Mendes GD, De Nucci G. [Comparative bioavailability study with two capecitabine tablet formulations administered with food in healthy subjects..](#) 2018 Aug 14. doi: 10.5414/CP203239.

This dissertation is for academic use only and it is not going to be used for comercial, advertising or promotion purposes. I am planning to make three printed copies of my dissertation. One of these copies will be displayed at The University (Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brazil) library. In addition, an eletronic version of the dissertation will be made available at the University Thesis Database. I thank you very much in advance.

Best regards

Mariana Machado Matos

Departamento de Farmacologia -FCM

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brazil



©2018 Dustri-Verlag Dr. K. Feistle
ISSN 0946-1965

DOI 10.5414/CP203239
e-pub: August 14, 2018

Comparative bioavailability study with two capecitabine tablet formulations administered with food in healthy subjects

Mariana Machado Matos¹, Renan Arthur Bosio-Guimarães², Ana Júlia Schmidt Niederauer², Katia Isabel Fercondini Pastre³, Ronilson A. Moreno⁴, Simone Grigoletto Schramm³, Paulo Alexandre Rebelo Galvinas³, Gustavo D. Mendes^{2,4,5}, and Gilberto De Nucci^{1,2,5}

¹Department of Pharmacology, State University of Campinas, ²Faculty of Medicine, São Leopoldo Mandic (SLMANDIC), Campinas, ³Magabi Pesquisas Clínicas e Farmacêuticas, São Paulo, ⁴Galeno Desenvolvimento de Pesquisas Ltda, Campinas, and ⁵Department of Pharmacology, Brazil University, Fernandópolis, Brazil

Key words

tandem mass spectrometry – HPLC/MS/MS – bioavailability – pharmacokinetics – food – bioequivalence – API

Abstract. Capecitabine is a prodrug and is selectively activated by tumor cells to its cytotoxic moiety, 5-fluorouracil, by thymidine phosphorylase, which is generally expressed at high levels in tumors. Clinical and pharmacokinetic studies of capecitabine have been performed in patients with cancer. This study aims to evaluate the bioequivalence of two capecitabine formulations (150-mg tablet) using healthy male subjects under non-fasting conditions. The study was conducted as an open, randomized, three-period, semi-replicated design with three sequences (RRT, RTR, TRR) with a 1-week washout interval. The subjects were selected for the study after having their health status previously assessed by a clinical evaluation and laboratory tests (biochemical and hematological parameters, and urinalysis). A single capecitabine tablet (150 mg) was given in each occasion. Plasma capecitabine concentrations were analyzed by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (HPLC/MS/MS) with positive ion electrospray ionization using multiple reactions monitoring (MRM). The geometric mean and 90% confidence intervals (CI) of capecitabine/Xeloda[®] (T/R) percent ratio were 104.34% (98.74 – 110.25%) for AUC_{last}, 103.06% (97.48 – 108.96%) for AUC_{inf}, and 104.07% (88.13 – 122.90%) for C_{max}. Since the 90% CI for C_{max}, AUC_{last}, and AUC_{inf} ratios were all inside the 80 – 125% interval proposed by the US Food and Drug Administration Agency, it was concluded that the capecitabine formulation elaborated by Eurofarma Laboratórios Ltda. is bioequivalent to Xeloda[®] formulation for both the rate and the extent of absorption. The drug was well tolerated by the subjects, indicating that it is safe to perform capecitabine bioequivalence studies in healthy male subjects.

Introduction

Capecitabine (N4-pentyloxycarbonyl-5'-deoxy-5-fluorocytidine) is a prodrug that is metabolized in the liver to 5'-deoxy-5-fluorocytidine by carboxylesterase 1, later to 5-deoxy-5-fluorouridine by cytidine deaminase, and then to 5-fluorouracil (5-FU) by thymidine phosphorylase (TP) [1]. Higher levels of TP are found in several tumors as compared to normal healthy tissue [2]. Capecitabine is employed as an adjuvant treatment for colon cancer and for the treatment of metastatic breast cancer, in particular in patients whose pathology did not improve during treatment with other therapeutic agents [2].

In adults, after two doses of 1,250 mg/m² or 2,000 mg, capecitabine has a bioavailability of ~ 100% with a C_{max} of 2.68 – 3.49 mg/L, t_{max} of 1.5 to 2 hours, AUC of 4.94 – 7 – 25 mg×h/L, T_{1/2} of 0.48 – 0.89 hours, and ke 0.78 – 1.26 1/hour [1, 3, 6].

Bioequivalence studies for capecitabine and other antineoplastic drugs have been performed in patients with cancer [4, 5, 6, 7] as well as in healthy patient [8, 9]. Some patients had related fluoropyrimidines toxicity during treatment, and it could be attributed to pharmacogenetic factors, focused on a genetic deficiency of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) [10].

The aim of this study was to assess the bioequivalence in healthy subjects with a single capecitabine 150-mg tablet formulations in healthy male subjects. A pilot

Received
January 30, 2018;
accepted
April 12, 2018

Correspondence to
Gustavo D. Mendes,
PhD
415 Jesuino Marcondes
Machado Ave.,
13092-320, Campinas,
SP Brazil
mendesgd@
yahoo.com.br

study performed in healthy subjects by our research group indicated that capecitabine presented high variability [11]. Thus, a semi-replicated design with 3 sequences (RRT, RTR, and TRR) was employed. Capecitabine plasma levels were measured by high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC/MS/MS), as reported by us in our pilot study of capecitabine [11].

Materials and methods

Demographic data

The healthy male subjects ($n = 84$) were aged between 18 and 55 years and were within 15% of ideal body weight. The ideal body weight was ≥ 18.5 and ≤ 25 for body mass index. It was based in Report of the Dietary Guidelines Advisory Committee on the Dietary Guidelines for Americans, 2000, U.S. Department of Agriculture U.S. Department of Health and Human Services. Demographic data were: age: 31.30 (mean) ± 10.56 (SD); 18 – 53 (range), height: 174 ± 0.06 ; 160 – 187 cm, body weight: 74.42 ± 9.73 ; 55 – 99 kg.

Laboratory tests

The subjects did not present any significant cardiac, hepatic, renal, pulmonary, neurological, gastrointestinal, and hematological diseases, as assessed by clinical examination, ECG, and no clinical alteration in the following laboratory tests: blood glucose, urea, creatinine, AST, ALT, alkaline phosphatase, γ glutamil transpeptidase (GT), total bilirubin and fractions, uric acid, total cholesterol, triglycerides, albumin and total protein, hemoglobin, hematocrit, total and differential white cell counts, urinalysis and protoparasitologic test. All subjects were negative for HIV, HBV (except for serological scar), and HCV. The laboratory tests (blood and urine) were repeated 1 – 3 days after each drug administration. The study began with 84 healthy subjects, and 77 completed the clinical study.

Clinical protocol

The protocol was submitted and approved by the Ethics Committee of the State University of Campinas (Protocol no. 969.185), and all subjects signed a written informed consent following evaluation by a doctor. The subjects initially were selected in accordance with the inclusion/exclusion criteria in the ambulatory unity. The studies were conducted in accordance with the provisions of the Declaration of Helsinki (1964), Tokyo (1975), Venice (1983), Hong Kong (1989), Somerset West (1996), Edinburgh (2000), Washington (2002), Tokio (2004), Seoul (2008), and Fortaleza (2012) revisions [12].

After screening, the individuals who qualified were confined for 3 periods of ~ 38 hours, respectively. Between each confinement was a 1-week pause. The study was conducted in an open, randomized, three-period crossover. During each period, the subjects were hospitalized at 6:00 PM on the day before drug administration and ate a normal evening meal and night lunch at the hospitalization site. After overnight 8 hours fasting, a single 150-mg dose of the appropriate capecitabine tablet formulation along with 200 mL of tap water was administered at 7:00 AM, 30 minutes after consuming a standard high-fat breakfast of 800 calories. A lunch (1,152.8 calories) and an evening meal (1,133.7 calories) were provided at 5 and 11 hours after dosing, respectively, for both groups. No other food was permitted during the “in-house” period. Liquid consumption was permitted ad libitum after lunch, but xanthine-containing drinks including tea, coffee, or cola were not permitted. Total calories of all meals together were 3,860 cal.

Blood samples (7 mL) from a suitable antecubital vein were collected into heparin-containing tubes before and 0.083, 0.17, 0.25, 0.33, 0.5, 0.67, 0.83, 1, 1.17, 1.33, 1.5, 1.67, 1.83, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 6, and 7 hours postdose, after the administration of each dose. The blood samples were centrifuged at 2,000 g for 10 minutes at 4 °C and the plasma decanted and stored at -20 °C until being assayed for capecitabine contents.

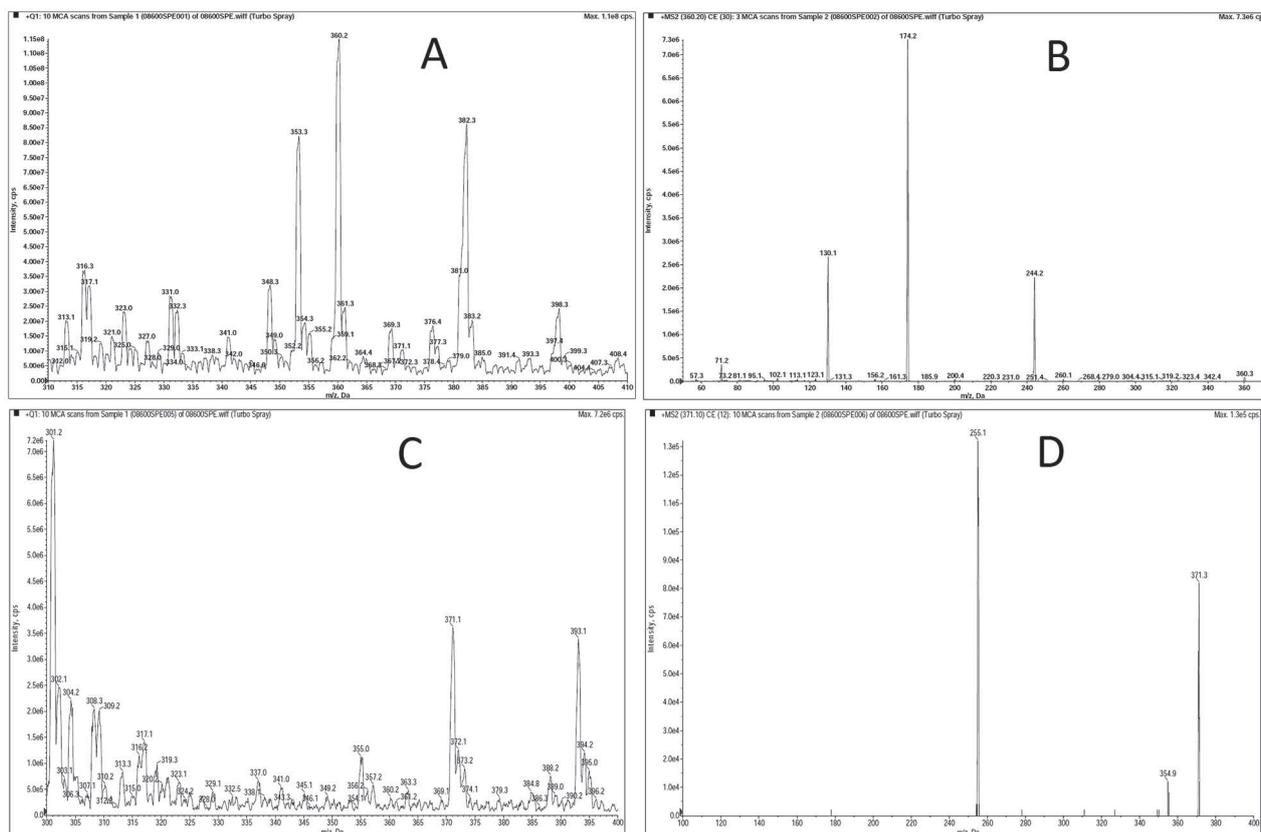


Figure 1. Full scan mass spectra of capecitabine in panel “A”, product ion spectra of capecitabine in panel “B”, full scan mass spectra of d11-capecitabine in panel “C”, product ion spectra of d11-capecitabine in panel “D”.

Formulations

The following formulations were employed: capecitabine test formulation 150 mg (formulation name: “capecitabine”; lot number: 420/14; expiration date: August 01/2017; Eurofarma Laboratórios Ltda, São Paulo, Brazil) and reference formulation (Xeloda, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland) 150 mg (lot number: X3365B08, expiration date: 02/2016).

Calibration standards and quality controls

Stock solutions of capecitabine (USP/EUA, LOT GOJ205, validated 20/04/2016) and the internal standard (IS) d-11 capecitabine were prepared in methanol/water (80 : 20, v/v) at concentrations of 1 mg/mL. Calibration curves of capecitabine were prepared by spiking blank plasma at concentrations of 1.0, 2.0, 10.0, 50.0, 200.0, 500.0, 750.0, and 1,000.0 ng/mL, and each concen-

tration was analyzed in duplicate. The quality control samples were prepared daily in blank plasma at concentrations of 3.0, 150.0, 400.0, and 800.0 ng/mL. For each validation, eight for each quality control level were analyzed (three validations were performed). The spiked plasma samples (standards and quality controls) were extracted in each analytical batch along with the unknown samples.

Drug analysis

Capecitabine and the IS were extracted from plasma samples and quantified by liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC/MS/MS) with positive electrospray ionization using multiple reaction monitoring (MRM).

Briefly, 0.2 mL of each plasma sample was introduced into a glass tube followed by 0.05 mL of the IS solution (50 ng/mL). The tubes were briefly vortex-mixed, and the compounds of interest were extracted with 1 mL of ether/dichloromethane (70/30;

v/v). The mixture was vortex-mixed for ~ 30 seconds. The samples were then centrifuged at 2,000 g for 3 minutes. The upper phase (organic phase) was then transferred to another clean test and evaporated under N₂ at 40 °C. The dry residues were reconstituted with 0.2 mL of methanol/water (70/30; v/v) + 3 mM formic acid and vortex-mixed for 10 seconds. The solutions were then transferred to the auto-injector microvials.

The high-performance liquid chromatography (HPLC) was performed on C₁₈, 5 µm (50 × 4.6 mm i.d.; Phenomenex, Gemini (Phenomenex, Torrance, CA, USA)) at a flow rate of 1.2 mL/min at 40 °C. Pressure of the system was ~ 105 bar. The mobile phase was methanol/water (55/45; v/v) + 3 mM formic acid. The temperature of the auto sampler was maintained at 6 ± 2 °C, and the injection volume was 0.04 mL.

Typical standard retention times were 1.90 ± 0.29 minutes for capecitabine and 1.84 ± 0.28 minutes for the IS, and the total run-time was 2.75 minutes. The mass spectrometer (API 5000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)) equipped with an electrospray source using a crossflow counter electrode was run in positive mode (ES+) with MRM. The mass spectrometer was set as follows: 360.2 > 244.2 and 37/1.1 > 255.1, for capecitabine and d11-capecitabine, as the precursor ions m/z and the respective product ions. Figure 1 shows a full scan mass spectra of capecitabine in panel “A”, product ion spectra of capecitabine in panel “B”, full scan mass spectra of capecitabine d-11 in panel “C”, and product ion spectra of capecitabine d-11 in panel “D”.

The source block temperature was set at 600 °C and the turboionspray voltage to 4.5 kV. Nitrogen was used as collision gas. For capecitabine and IS, the declustering potential, collision energy, and collision exit potential were 5 (V), 15 (eV), and 50 (V), respectively. Data were acquired by Analyst software (1.4.1, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Linearity

Linearity was determined to assess the performance of the method. A linear least-squares regression with a weighting index of 1/x² was performed on the peak area ratios

of capecitabine and the I.S. vs. capecitabine concentrations of the eight plasma standards in duplicate to generate the calibration curve. Weight regression was employed since it enhances the accuracy in the lower part of the concentration curve.

Limit of detection and quantification

The limit of detection (LOD) and the lower limit of quantification (LLOQ) were calculated as the concentrations with a signal-to-noise ratio of 3 and 10, respectively. Each back-calculated concentration standard should meet the following acceptable criteria: no more than 20% deviation.

Precision and accuracy

Within- and between-run precision were determined as the coefficient of variation, (CV) (%) = 100 (SD/M) and the accuracy (%) by 100 (M/T), where M is the mean, SD is the standard deviation of M, and T is the theoretical concentration.

Stability

To assess stability, quality control plasma samples (3.0 and 800 ng/mL) were subjected to short-term (15 hour) incubation at room temperature; 4 freeze/thaw (20 °C) cycles; 119 hours in the autosampler (6 °C ± 2); and a long-term incubation (800 days). Subsequently, the capecitabine concentrations were measured and compared with freshly-prepared samples.

Pharmacokinetics and statistical analysis

The study was conducted as an open study, randomized, semi-replicate, with 3 administrations, 3 periods (3 sequences), within-subject receiving, in each distinct period, test formulation (1 occasion), or reference formulation (2 occasions). The subjects were randomized to one of the sequences of administration (RRT, RTR, TRR).

Table 1. Adverse event during the study.

Subject	Adverse effect
3	Subject reported use of naldecon (400 mg paracetamol + 20 mg phenylephrine), 1 dose due to cold. Event classified by the physician as unrelated to therapy.
7	Subject reported use of dorflex (300 mg dipyron monohydrate dipyron + 35 mg orphenadrine citrate + 50 mg anhydrous caffeine), 1 dose due to headache. Event classified by the physician as unrelated to therapy.
8	Hypertriglyceridemia (259 mg/dL) date 05/28/15. Event classified by the physician as unrelated to therapy. Subject remained under observation and recovered fully. Duration of 5 days (184 triglycerides mg/dL) 06/02/2015.
13	Subject reported use of neosaldina (300 mg dipyron + 30 mg isometheptene mucate + 30 mg caffeine), 1 dose. Event classified by the physician as unrelated to therapy.
16	Subject reported use of dipyron, 1 dose 500 mg. Event classified by the physician as unrelated to therapy.
19	Subject reported use of diclofenac resinate 30 mg (8 h/8 h) and 8 ketorolac topical trometamol/8 h due to conjunctivitis. Event classified by the physician as unrelated to therapy.
31	Hypertriglyceridemia (362 mg/dL) date 06/17/15. Event classified by the physician as unrelated to therapy. Conduct: note and full recovery. (Triglycerides = 211 mg/dL – date 06/24/15).
31	Subject reported use of cimegripe (400 mg paracetamol + 4 mg chlorpheniramine maleate + 4 mg phenylephrine hydrochloride), 1 dose. Event classified by the physician as unrelated to therapy.
31	Hypertriglyceridemia (287 mg / dL) date 07/01/15. Event classified by the physician as unrelated to therapy. Subject in dietary guidance. Repetition of examinations in 30 days.
33	Hypertriglyceridemia (295 mg / dL) date 06/03/15. Event classified by the physician as unrelated to therapy. Subject kept under observation and full recovery (triglycerides = 266 mg / dL) date 06/10/15.
38	Subject reported use of aspirin 100 mg because of headache. Event classified by the physician as unrelated to therapy.
38	Subject reported cold. Event classified by the physician as unrelated to therapy. Self-medication with resfenol (400 mg paracetamol + 4 mg chlorpheniramine maleate + 4 mg phenylephrine hydrochloride), 1 tablet, VO.
57	Subject reports using neosaldina (300 mg dipyron + 30 mg isometheptene mucate + 30 mg caffeine) 1 tablet due to headache. Event classified by the physician as unrelated to therapy.
57	Hypertriglyceridemia (261 mg/dL) date 06/16/15. Event classified by the physician as unrelated to therapy. Subject was kept under observation. Evolution: On 6/23/15 (range P2/P3) triglycerides = 266 mg/dL. Full recovery. Triglycerides of 78 mg/dL.
57	Headache. Event classified by the physician as possibly related to therapy. Treatment with paracetamol 750 mg VO.
66	Subject reported use of nimesulide 100 mg because muscle pain after physical activity. Event classified by the physician as unrelated to therapy.
70	Subject reported use of nimesulide 100 mg due to headache. Event classified by the physician as unrelated to therapy.
72	Headache. Event classified by the physician as possibly related to therapy. Treatment with paracetamol 750 mg VO.
73	Penetrating injury to the left eye due to needle drop with syringe; event classified as other - accidental injury to left eye cornea requiring immediate surgical procedure (suture). Not expected, intense, no relation to the therapy. Immediate procedure sedation to perform surgery (corneal suturing).
73	Hypertriglyceridemia (301 mg/dL) date 07/14/15. Event classified by the physician as unrelated to therapy. Subject was kept under observation with dietary guidelines.
77	Hypertriglyceridemia (280 mg/dL) date 06/17/15. Event classified by the physician as unrelated to therapy. Subject was kept under observation. Evolution of 06/23/15 (P2/P3 interval) with a triglyceride = 273 mg/dL. Subject was kept under observation and recovered fully. Triglycerides = 175 mg/dL date 07/01/15.
80	Bilateral conjunctivitis. Event classified by the physician as unrelated to therapy. Subject had passed by an ophthalmologist who indicated that only local hygiene with saline was necessary. Conduct: Maintained prior indication of local hygiene with saline. Outcome in 06/25/15 with full recuperation. Subject was excluded from the study by decision of the team due to positive response to the exclusion criteria.

Bioequivalence between the three formulations was assessed by calculating individual test/reference ratios for the peak of concentration (C_{max}), the area under the curve (AUC) of the plasma concentration until the last concentration observed (AUC_{last}), and the area under the curve between the first sample (predosage) and infinity (AUC_{0-inf}).

An analysis of variance (ANOVA), with fixed effects for sequence, period, and administration and random effect for participant within the sequence, was conducted

using logarithmic transformation of AUC_{last} . The 90% CI for the geometric means ratio of the AUC_{last} parameter was calculated. The decision criterion was IC90% (80%; 125%).

The C_{max} was analyzed following the statistical method recommended by the WHO [13]. For C_{max} , the intrasubject standard deviation was calculated for the reference product (SWR), which was expressed by the coefficient of variation (CVWR). If CVWR was < 30% for C_{max} , then the 90% CI for the ratio of the geometric means of the param-

Table 2. Laboratory exams before and after administration of 150 mg capecitabine.

Parameter	Unit	Pre-study				Post-study			
		Mean	Min	Max	SD	Mean	Min	Max	SD
Hemoglobin	g%	15.16	12.80	17.60	0.99	14.20	4.83	17.50	1.79
Hematocrit	%	45.41	39.70	51.30	2.87	42.90	15.00	52.10	5.36
Erythrocytes	106/mm ³	5.20	4.40	6.35	0.39	5.99	3.89	48.50	6.51
M.C.V	Micra ³	87.62	68.80	99.80	5.15	87.82	68.50	97.30	5.27
M.C.H	Pg	29.27	21.70	33.10	1.97	29.08	21.70	32.40	1.92
M.C.H.C	%	33.40	31.50	34.90	0.70	33.11	30.70	34.40	0.61
R.D.W	%	13.34	12.00	17.70	0.81	13.57	11.80	16.50	0.69
Platelets	10 ³	226,107	130,000	352,000	46,926	242,663	140,000	393,000	50,771
Leukocytes	10 ³ /mm ³	6,644	3,900	11,700	1,678	6,922	4,400	15,300	1,911
Rods	%	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Segmented	%	54.88	37.60	74.00	8.09	56.37	42.90	73.00	7.88
Eosinophils	%	3.72	0.00	18.90	3.17	3.92	0.60	16.00	3.19
Basophils	%	0.44	0.00	0.90	0.18	0.49	0.00	1.50	0.22
Lymphocytes	%	32.62	19.40	50.90	7.45	31.00	17.00	45.20	6.71
Monocytes	%	8.34	4.90	13.30	1.67	8.22	5.00	11.60	1.50
Glycemia	mg/dL	74.92	46.00	105.00	10.74	78.04	61.00	119.00	9.83
Urea	mg/dL	29.54	13.00	44.00	5.96	28.90	17.00	45.00	6.31
Creatinine	mg/dL	0.93	0.60	1.30	0.14	0.93	0.60	1.30	0.13
Total proteins	g/dL	7.25	5.40	8.40	0.51	6.96	5.80	8.30	0.46
Albumin	g/dL	4.41	3.60	5.10	0.23	4.23	3.50	4.90	0.23
Total bilirubin	mg/dL	0.77	0.35	1.83	0.33	0.68	0.28	2.08	0.31
Total cholesterol	mg/dL	165.44	93.00	238.00	33.20	165.59	95.00	251.00	32.96
Triglycerides	mg/dL	101.21	32.00	266.00	54.70	97.96	29.00	301.00	54.25
S.G.O.T.	U/L	20.58	12.00	44.00	6.57	19.02	12.00	43.00	4.52
S.G.P.T.	U/L	21.54	7.00	73.00	12.25	20.08	6.00	79.00	11.48
Alkaline phosphatase	U/L	60.74	16.00	124.00	18.24	61.39	19.00	109.00	17.17
γ-GT	U/L	29.70	9.00	104.00	19.58	28.08	10.00	108.00	17.70
Uric acid	mg/dL	5.45	3.40	7.60	0.94	5.40	3.50	8.00	0.90
Density	–	1,021.19	1,005.00	1,030.00	7.15	1,020.11	1004.00	1,030.00	6.88
pH	–	5.87	5.00	8.00	0.54	5.84	5.00	7.50	0.53
Leukocytes	/mL	6,474.64	2,000.00	11,700.00	1,879.67	6,189.02	1,000.00	15,300.00	2,443.28
Erythrocytes	/mL	2,476.19	1,000.00	31,000.00	4,347.76	1,682.93	1,000.00	15,000.00	2,107.47

M.C.V = mean corpuscular volume; M.C.H = mean corpuscular hemoglobin; M.C.H.C = mean corpuscular hemoglobin concentration; R.D.W. = red cell distribution width; S.G.O.T. = Serum glutamic oxaloacetic transaminase; S.G.P.T. = serum glutamic pyruvic transaminase.

eter C_{max} had the acceptance range of IC90% (80%, 125%). If CVWR for C_{max} is > 30%, then the acceptance range was expanded based on the following formula:

$$[L, U] = \exp [\pm k \times \text{SWR}],$$

Where L is the lower limit of the acceptance range, U is the upper limit of the acceptance range, k is the regulatory constant = 0.760, and SWR is the intrasubject standard deviation of the log-transformed values of the reference product C_{max} (comparator). If CVWR \geq 50%, the maximum limit of the permitted CI, i.e., 90% CI (69.84%, 143.19%), was to be adopted. In any case, the geometric mean of the C_{max} ratio was to be contained in the range (80.00 – 125.00%).

Results

77 subjects out of a total of 84 were included in the statistical analyses due to withdrawal/exclusion (subjects 2, 42, 50, 71, and 79 were excluded by withdrawal; subjects 73 and 80 were excluded by exclusion criteria). There were 21 adverse effects in the study (Table 1). One of them was considered serious (penetrating injury to the left eye due to needle drop with syringe and obviously not related to drug administration (accidental injury left eye cornea requiring immediate surgical procedure). The biochemical and hematological parameters presented no clinically-relevant alterations (Table 2).

Table 3. Accuracy and precision data for capecitabine from the prestudy validation in human plasma.

Nominal concentration (ng/mL)	CQB-3.000				CQM-400.000				CQA-800.000			
	PH08601VA01	PH08601VA02	PH08601VA04									
Analytical run	2.865	2.974	2.791	373.922	395.107	409.644	730.816	788.763	772.489			
Quality control 1	2.945	2.985	2.941	366.223	412.395	415.585	741.007	858.347	782.631			
Quality control 2	2.906	3.098	2.986	368.382	417.438	422.489	720.096	867.615	779.015			
Quality control 3	2.983	3.322	2.877	379.447	415.085	413.619	739.296	868.988	818.753			
Quality control 4	2.851	3.329	2.943	365.190	431.241	412.378	726.648	865.857	795.107			
Quality control 5	2.943	3.421	3.019	373.393	437.875	405.747	729.143	875.135	802.754			
Quality control 6												
Intrabatch validation												
Mean (ng/mL)	2.916	3.188	2.926	371.093	418.190	413.244	731.168	854.118	791.792			
Precision (CV%)	1.700	6.100	2.800	1.500	3.600	1.400	1.100	3.800	2.200			
Accuracy (%)	97.200	106.300	97.500	92.800	104.500	103.300	91.400	106.800	99.000			
Interbatch validation												
Mean (ng/mL)	3.010			400.842				792.359				
Precision (CV%)	5.800			5.900				7.000				
Accuracy (%)	100.300			100.200				99.000				

The method was linear regression for capecitabine concentrations from 1 to 1,000 ng/mL (calibration curve $y = -9.62E-04 + 2.82E-02x$, $r^2 > 0.9998$). A linear regression with a weighting index of $1/x$ was performed on the peak area ratios of capecitabine and the IS versus the capecitabine concentrations of the eight human plasma standards (in duplicate) to generate a calibration curve. The limit of quantification (LOQ), defined as the lowest concentration at which both the precision and accuracy were $< 20\%$, was 1.0 ng/mL. The within- and between-run precision and accuracy for the LOQ and quality controls are summarized in Table 3. No endogenous peak was observed in the mass chromatogram of blank plasma (Figure 2). The retention times for capecitabine and the IS were 1.90 ± 0.29 minutes and 1.84 ± 0.28 minutes, respectively (Figure 2). The stability tests indicated no significant degradation under the described conditions.

The mean capecitabine plasma concentration vs. time profiles after a single oral dose of each 150-mg tablet formulation of capecitabine in fasting are shown in Figure 3. Table 4 shows the mean pharmacokinetic parameters obtained from subjects after the administration of 150-mg capecitabine tablet. Table 5 shows geometric mean of the individual C_{max} and AUC_{last} (test/reference formulation), the respective 90% CI and the statistical power.

Discussion

Capecitabine treatment of metastatic cancer consists of a 14-consecutive-day administration (2,500 mg/m² daily) followed by 1 week of no drug (3-week cycles) [4, 5, 6]. The incidence of adverse reactions observed in breast and colorectal cancer patients (the average therapy was 127 days) was as follows: 1 – 10%: taste disturbance, chest pain, alopecia, gastrointestinal hemorrhage, thrombocytopenia, cough, venous thrombosis, dehydration, skin/nail discoloration, insomnia, back pain, oral discomfort, gastrointestinal motility disorder, dizziness, arthralgia/myalgia, headache; 11 – 20%: dyspnea, neuropathy/paresthesia, eye irritation, edema, constipation, neutropenia, pyrexia; 21 – 30%: lymphopenia, stomatitis, anorexia, dermatitis, vomiting; 31 – 40%:

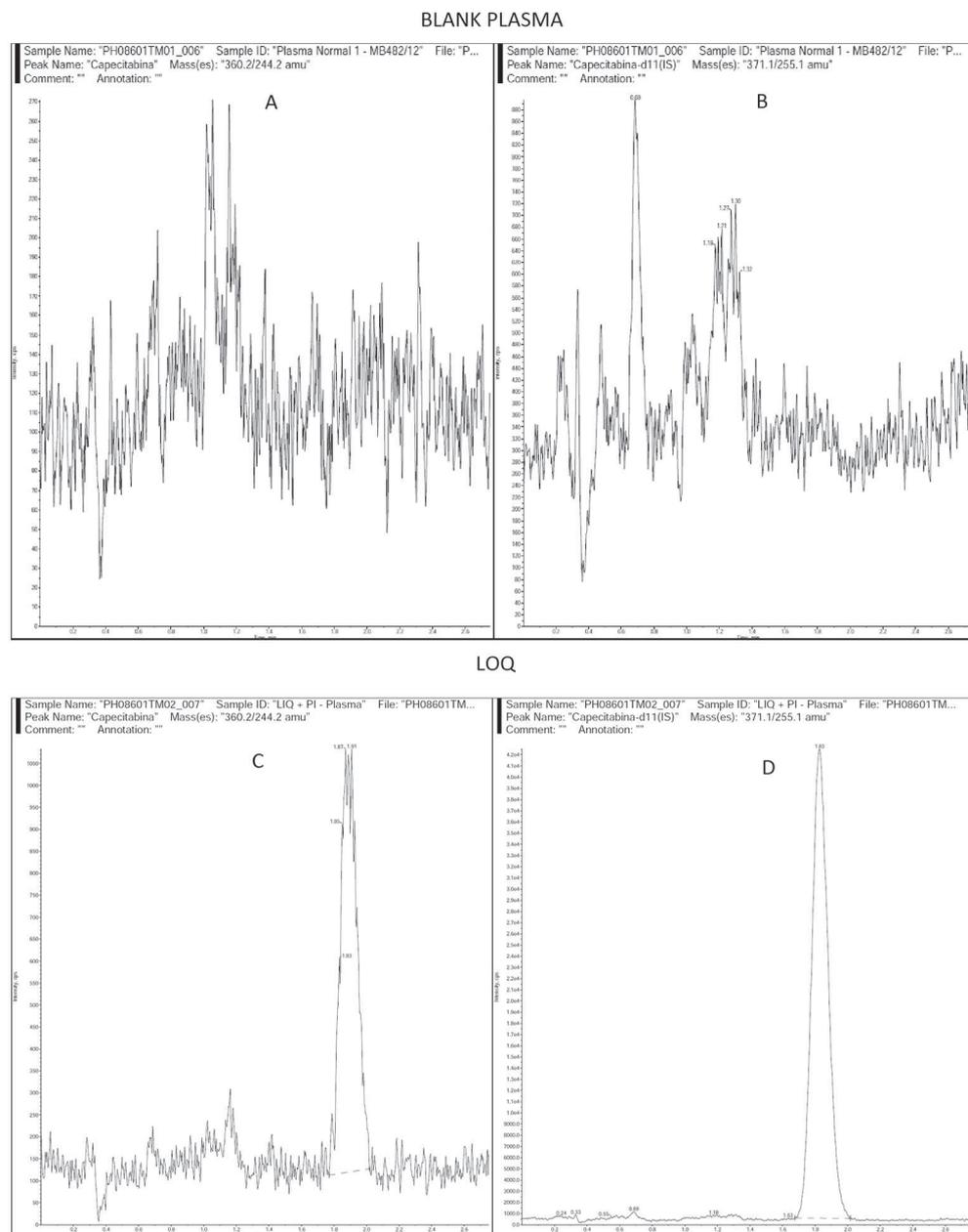


Figure 2. MRM chromatograms of blank normal human plasma: A: capecitabine and (B) d11-capecitabine; MRM chromatograms of the LOQ: C: capecitabine and (D) d11-capecitabine.

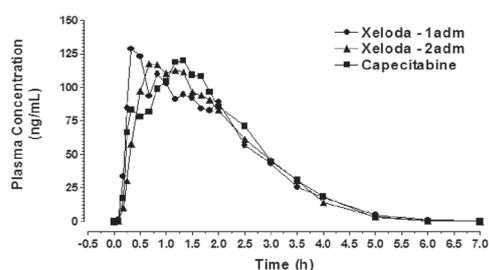


Figure 3. Capecitabine plasma mean concentrations (SD) vs. time profile obtained after oral administration of 150 mg of capecitabine formulation.

abdominal pain; 41 – 50%: fatigue/weakness, hyperbilirubinemia, nausea; > 50%: hand-foot syndrome, diarrhea, anemia [2, 3].

Some subjects in this study had some adverse effects that could be checked on Table 1. Only subjects 57 and 72 had headaches, and this was classified by the physician as not serious, weak, and possible relation to therapy. Subject 80 was excluded from the study after positive response to the exclusion criteria. The adverse events demonstrated the safety of capecitabine studies in healthy subjects.

Table 4. Mean pharmacokinetic parameters of the capecitabine formulations in subjects under fed conditions.

Variable	AUC (%)	AUC _{inf} (ng×h/mL)	AUC _{last} (ng×h/mL)	C _{max} (ng/mL)	T _{1/2} (h)	Ke (1/h)	t _{max} (h)
Formulation	Reference						
Administration	First administration						
N	75	75	77	77	75	75	77
Mean	1.66	287.65	283.15	337.69	0.53	1.65	1.66
Geometric mean	0.55	276.22	270.54	250.49	0.45	1.54	1.32
SD	5.44	78.88	81.03	288.13	0.56	0.47	1.00
Min	0.13	92.57	80.66	37.99	0.25	0.16	0.25
Median	0.51	280.67	273.26	237.14	0.41	1.68	1.50
Max	36.02	453.82	452.47	1,479.79	4.39	2.79	4.00
CV	327.07	27.42	28.62	85.32	105.51	28.54	60.23
Formulation	Reference						
Administration	Second administration						
N	77	77	77	77	77	77	77
Mean	0.69	280.32	278.49	325.37	0.42	1.77	1.53
Geometric mean	0.53	271.56	269.68	264.41	0.40	1.71	1.30
SD	0.63	71.72	71.63	226.54	0.11	0.44	0.83
Min	0.15	129.97	129.29	70.72	0.25	0.88	0.25
Median	0.49	275.00	274.07	254.54	0.39	1.78	1.33
Max	3.57	505.01	502.56	941.00	0.78	2.80	3.50
CV	91.95	25.58	25.72	69.63	27.06	25.10	54.27
Formulation	Test						
N	75	75	77	77	75	75	77
Mean	0.65	288.68	288.83	327.29	0.41	1.78	1.68
Geometric mean	0.51	280.27	280.21	268.77	0.40	1.74	1.40
SD	0.54	70.71	71.56	231.70	0.10	0.38	0.93
Min	0.15	146.87	143.20	63.31	0.23	0.79	0.25
Median	0.49	272.44	275.54	258.25	0.40	1.73	1.50
Max	2.83	496.50	495.76	1,353.07	0.88	3.02	4.00
CV	83.21	24.50	24.78	70.79	24.37	21.41	55.32

Many different methods have been used for capecitabine quantification in human plasma samples by HPLC/MS/MS (LOQ 1 – 150 ng/mL, retention time 2.4 – 11.5 minutes, run time of 4.5 – 15 minutes, liquid-liquid extraction) [14, 15, 16, 17, 18, 19]. Our method has good sensitivity (LOQ of 1 ng/mL), retention time of 1.90 minutes, run time of 2.8 minutes, liquid-liquid extraction and deuterated IS, permitting a high throughput. As demonstrated in this study, the present HPLC/MS/MS method is simple and selective for the determination of capecitabine in human plasma.

The area extrapolated to infinity was greater than 20% on three occasions out of a total of 231 capecitabine administrations. The lowest C_{max} concentration in the study was 37.99 ng/mL, or 40 times the limit of quantification (1 ng/mL). No subject presented maximum concentration occurring at the first collection time (0.08 hours). These

facts demonstrate that the analytical method and clinical protocol were adequate for the pharmacokinetic study of capecitabine.

The C_{max} (reference – first administration: 337.68 ng/mL; reference – second administration: 325.36 ng/mL) in the final study was 28.38% (mean) smaller than C_{max} in the pilot study (reference 462.88 ng/mL; Mendes et al. 2011 [11]) in the same dose and fed condition. The C_{max} (test: 327.29 ng/mL;) in final study was 53.57% smaller than C_{max} in the pilot study (test 704.89 ng/mL; Mendes et al. 2011 [11]) in the same dose and fed condition. The AUC_{last} (reference – first administration: 283.15 ng×h/mL; reference – second administration: 278.49 ng×h/mL) in the final study was 6.54% (mean) smaller than AUC_{last} in the pilot study (reference 300.49 ng×h/mL; Mendes et al. 2011 [11]) in the same dose and fed condition. The AUC_{last} (test: 288.82 ng×h/mL;) in the final study was 16.14% smaller than AUC_{last} in the

Table 5. Statistical analysis for the capecitabine formulations under fed conditions.

Parameter	Ratio %	Lower-limit %	Upper limit %
C _{max}	104.0766	88.1322	122.9057
AUC _{last}	104.3403	98.7468	110.2506
AUC _{inf}	103.0665	97.4852	108.9673

pilot study (test 344.42 ng×h/mL; Mendes et al. 2011 [11]) in the same dose and fed condition. These facts can be explained by the high intrasubject variability (C_{max} ~ 75% and AUC ~ 20%) for capecitabine and by the difference in the number of subjects in the studies (pilot n = 8, final study n = 77).

Capecitabine is employed for the treatment of metastatic cancer, therefore, the prognosis of these patients is usually not good. Whether it is ethical expose these critically-ill patients to either ineffective or toxic doses of the drug (due to unforeseen infra- or suprabio-availability of the test formulation), to experimental procedures such as internment, venous puncture, and blood collection to evaluate bioequivalence should be re-evaluated. Furthermore, studies performed in patients are with therapeutic doses, using several tablets for each administration (generally a combination of both 150-mg and 500-mg tablets), a procedure that limits the discrimination between dosage forms.

The usual therapeutic scheme employed consists of 2 g twice daily, for 2 weeks, followed by one-week interval. This scheme can be performed for 6 months or longer, depending on the therapeutic response observed. The dose administered to the healthy subjects was a single administration of 1 tablet of 150 mg, which represents less than 4% of the dose a patient would receive in one day, or less than 0.3% of the dose received in a single cycle.

Conclusion

Since the 90% CI for C_{max}, AUC_{last}, and AUC_{inf} ratios were all within the 80 – 125% interval proposed by the US Food and Drug Administration Agency, it was concluded that capecitabine formulation (150-mg tablet) produced by Eurofarma Laboratórios Ltda is bioequivalent to Xeloda[®] formulation for both the rate and the extent of absorption.

Funding

The bioequivalence trial was paid for by Eurofarma Laboratórios Ltda.

Conflict of interest

The authors report no conflict of interest.

References

- [1] Reigner B, Verweij J, Dirix L, Cassidy J, Twelves C, Allman D, Weidekamm E, Roos B, Banken L, Utoh M, Osterwalder B. Effect of food on the pharmacokinetics of capecitabine and its metabolites following oral administration in cancer patients. *Clin Cancer Res*. 1998; 4: 941-948. [PubMed](#)
- [2] Reigner B, Blesch K, Weidekamm E. Clinical pharmacokinetics of capecitabine. *Clin Pharmacokinet*. 2001; 40: 85-104. [CrossRef PubMed](#)
- [3] Walko CM, Lindley C. Capecitabine: a review. *Clin Ther*. 2005; 27: 23-44. [CrossRef PubMed](#)
- [4] FDA – Draft Guidance on Capecitabine. Recommended Jul 2008; Revised Aug 2010; Sep 2012. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance-ComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm083276.pdf>.
- [5] EMEA – Draft Capecitabine Product-Specific Bioequivalence Guidance. Recommended Oct 2013; Revised Feb 2014. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2013/11/WC500154312.pdf.
- [6] Cassidy J, Twelves C, Cameron D, Steward W, O'Byrne K, Jodrell D, Banken L, Goggin T, Jones D, Roos B, Bush E, Weidekamm E, Reigner B. Bioequivalence of two tablet formulations of capecitabine and exploration of age, gender, body surface area, and creatinine clearance as factors influencing systemic exposure in cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1999; 44: 453-460. [CrossRef PubMed](#)
- [7] Teresi ME, Riggs CE, Webster PM, Adams MJ, Noonan PK, O'Donnell JP. Bioequivalence of two methotrexate formulations in psoriatic and cancer patients. *Ann Pharmacother*. 1993; 27: 1434-1438. [CrossRef PubMed](#)
- [8] Bienvenu B, Aouba A, Gottenberg JE, Verstuyft C. Single-center, single-dose, open-label, randomized, two-period crossover study on the bioavailability of methotrexate administered using a novel prefilled, needle-free delivery system. *Curr Med Res Opin*. 2017; 33: 605-611. [CrossRef PubMed](#)
- [9] Park J-Y, Kim K-A, Lee Y-H, Park S-W, Lee G-H, Ryu J-H. Pharmacokinetic comparison and bioequivalence of two leflunomide formulations in humans: a single dose, randomized, open-label, two-way crossover study. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2010; 48: 291-295. [PubMed](#)
- [10] Takimoto C, Lu ZH, Zhang R, Liang MD, Larson LV, Cantilena LR Jr, Grem JL, Allegra CJ, Diasio RB, Chu E. Severe neurotoxicity following 5-fluorouracil-based chemotherapy in a patient with

- dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Clin Cancer Res.* 1996; 2: 477-481. [PubMed](#)
- [11] Mendes GD, Babadopulos T, Chen LS, Iha JO, Magalhães JCA, Alkharfy K, De Nucci G. The use of Healthy Volunteers to Evaluate Bioequivalence of Antineoplastic Drugs: Pilot Studies with Capecitabine. *J Bioequivalence Bioavailab.* 2011; *SI*: 10.4172/jbb.S1-005.
- [12] *WMA Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects.* (2013). Adopted by the 18th WMA General Assembly, Helsinki, Finland, June 1964; and amended by the: 29th WMA General Assembly, Tokyo, Japan, October 1975; 35th WMA General Assembly, Venice, Italy, October 1983; 41st WMA General Assembly, Hong Kong, September 1989; 48th WMA General Assembly, Somerset West, Republic of South Africa, October 1996; 52nd WMA General Assembly, Edinburgh, Scotland, October 2000; 53rd WMA General Assembly, Washington, DC, USA, October 2002 (Note of Clarification on paragraph 29 added); 55th WMA General Assembly, Tokyo, Japan, October 2004 (Note of Clarification on Paragraph 30 added); 59th WMA General Assembly, Seoul, Republic of Korea, October 2008; 64th WMA General Assembly, Fortaleza, Brazil, October 2013. <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>. Accessed 05 February 2017.
- [13] Working document QAS / 14.583 / Rev.11 July / 2014, http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/guideline-be-revision_qas14-583rev1_15072014.pdf
- [14] Montange D, Bérard M, Demarchi M, Muret P, Piédoux S, Kantelip JP, Royer B. An APCI LC-MS/MS method for routine determination of capecitabine and its metabolites in human plasma. *J Mass Spectrom.* 2010; 45: 670-677. [PubMed](#)
- [15] Vainchtein LD, Rosing H, Schellens JH, Beijnen JH. A new, validated HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of the anti-cancer agent capecitabine and its metabolites: 5'-deoxy-5-fluorocytidine, 5'-deoxy-5-fluorouridine, 5-fluorouracil and 5-fluorodihydrouracil, in human plasma. *Biomed Chromatogr.* 2010; 24: 374-386. [PubMed](#)
- [16] Licea-Perez H, Wang S, Bowen C. Development of a sensitive and selective HPLC/MS/MS method for the determination of alpha-fluoro-beta-alanine, 5-fluorouracil and capecitabine in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009; 877: 1040-1046. [PubMed](#)
- [17] Guichard SM, Mayer I, Jodrell DI. Simultaneous determination of capecitabine and its metabolites by HPLC and mass spectrometry for preclinical and clinical studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005; 826: 232-237. [PubMed](#)
- [18] Siethoff C, Orth M, Ortling A, Brendel E, Wagner-Redeker W. Simultaneous determination of capecitabine and its metabolite 5-fluorouracil by column switching and liquid chromatographic/tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2004; 39: 884-889. [CrossRef PubMed](#)
- [19] Deng P, Ji C, Dai X, Zhong D, Ding L, Chen X. Simultaneous determination of capecitabine and its three nucleoside metabolites in human plasma by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2015; 989: 71-79. [CrossRef PubMed](#)