
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Farmacocinetica și biodisponibilitatea gliclazidei din formulări cu cedare modificată

Doctorand: **Diana Ioana Pop**

Conducător științific: Prof.dr. **Laurian Vlase**

CLUJ-NAPOCA 2019



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Gestionarea diabetului	17
1.1. Diabetul zaharat - aspecte generale	17
1.2. Tipuri de diabet zaharat	17
1.3. Prevalența diabetului zaharat	18
1. 4. Factori de risc	18
1. 5. Prevenirea	19
1. 6. Diagnosticul și tratamentul	19
1. 7. Impactul economic al diabetului zaharat	20
2. Gliclazida	21
2. 1. Farmacodinamia și mecanismul de acțiune	21
2.1.1. Efecte asupra eliberării insulinei	21
2.1.2. Efectele extra-pancreatice	21
2.1.3. Alte acțiuni	22
2. 2. Contraindicații, atenționări speciale și precauții pentru utilizare	22
2.2.1. Hipoglicemia	22
2.2.2. Controlul deficitar al glicemiei	23
2.2.3. Teste de laborator	23
2. 3. Reacții adverse	23
2.3.1. Hipoglicemia	24
2.3.2. Alte evenimente adverse	24
2. 4. Proprietăți farmacocinetice	25
2.4.1. Absorbție, distribuție, biotransformare și eliminare	25
2.4.2. Liniaritate / non-liniaritate	26
2.4.3. Efectul alimentelor	26
2.4.4. Grupe speciale de pacienți	26
2. 5. Interacțiuni	26
2.5.1. Interacțiuni medicamentoase	26
2.5.2. Interacțiuni cu stilul de viață	26
3. Biodisponibilitatea comparată	27
4. Analiza farmacocinetică	31
4.1. Analiza farmacocinetică noncompartimentală	31
4.2. Analiza farmacocinetică compartimentală	33
5. Modele de corelație <i>In Vitro</i> - <i>In Vivo</i>	35
5.1. Nivele IVIVC	35
CONTRIBUȚII PERSONALE	39
1. Context / Obiective	39
2. Metodologie generală	41
2.1. Design-ul studiului	41
2.2. Dimensiunea eșantionului	42
2.3. Criterii de includere pentru subiecți	43
2.4. Administrarea medicamentelor	44
2.5. Standardizarea studiilor	44

2.6. Siguranță	44
2.7. Prelevarea și procesarea probelor de sânge	45
3. Studiul 1 - Metoda bioanalitică pentru determinarea concentrațiilor plasmatice ale gliclazidei	47
3.1. Introducere	47
3.2. Obiective	
3.3. Materiale și Metode	47
3.3.1. Instrumentație	48
3.3.2. Reactivi și materiale	48
3.3.3. Soluții standard	48
3.3.4. Procesarea probelor	48
3.3.5. Condiții cromatografice	49
3.3.6. Validarea metodei	49
3.4. Rezultate	49
3.5. Discuții	53
3.6. Concluzii	53
4. Studiul 2 - Bioechivalența a două formulări cu glicazidă 60 mg comprimate cu eliberare modificată într-un studiu randomizat, încrucișat la subiecți sănătoși caucazieni în condiții de repaus alimentar	55
4.1. Introducere	55
4.2. Obiective	55
4.3. Materiale și Metode	55
4.3.1. Subiecți	55
4.3.2. Design-ul studiului	55
4.3.3. Metoda bioanalitică	56
4.3.4. Analiza farmacocinetică și statistică	56
4.4. Rezultate	56
4.5. Discuții	79
4.6. Concluzii	79
5. Studiul 3 - Bioechivalența a două formulări cu glicazidă 60 mg comprimate cu eliberare modificată într-un studiu randomizat, încrucișat la subiecți sănătoși caucazieni în condiții post-prandiale	81
5.1. Introducere	81
5.2. Obiective	81
5.3. Materiale și Metode	81
5.3.1. Subiecți	81
5.3.2. Design-ul studiului	81
5.3.3. Metoda bioanalitică	82
5.3.4. Analiza farmacocinetică și statistică	82
5.4. Rezultate	82
5.5. Discuții	93
5.6. Concluzii	94

6. Studiul 4 - Efectul alimentelor asupra farmacocineticii comprimatelor cu eliberare modificată cu gliclazidă 60 mg la voluntari sănătoși caucazieni	95
6.1. Introducere	95
6.2. Obiective	95
6.3. Materiale și Metode	95
6.3.1. Analiza farmacocinetică și statistică	96
6.3.2. Evaluarea siguranței	96
6.4. Rezultate	96
6.4.1. Subiecți	96
6.4.2. Analiza farmacocinetică	97
6.4.3. Analiza statistică	99
6.4.4. Evaluarea siguranței	99
6.5. Discuții	100
6.6. Concluzii	101
7. Studiul 5 - Farmacocinetica gliclazidei după administrarea orală în doză unică a unui comprimat cu eliberare modificată cu gliclazidă 60 mg	103
7.1. Introducere	103
7.2. Obiective	103
7.3. Materiale și Metode	104
7.3.1. Subiecți	104
7.3.2. Design-ul studiului	104
7.3.3. Metoda bioanalitică	104
7.3.4. Analiza farmacocinetică compartimentală	104
7.4. Rezultate	108
7.5. Discuții	112
7.6. Concluzii	112
8. Studiul 6 - Corelații In Vitro – In Vivo pentru comprimatele cu eliberare modificată cu gliclazidă de 60 mg	113
8.1. Introducere	113
8.2. Obiective	114
8.3. Materiale și Metode	114
8.3.1. Date <i>in vivo</i>	114
8.3.2. Studii <i>in vitro</i>	114
8.3.3. Corelare <i>in vitro-in vivo</i>	115
8.4. Rezultate	115
8.4.1. Date <i>in vivo</i>	115
8.4.2. Date <i>in vitro</i>	115
8.4.3. Corelare <i>in vitro-in vivo</i>	116
8.5. Discuții	119
8.6. Concluzii	120
9. Concluzii generale	121
10. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	123
REFERINȚE	125

CUVINTE-CHEIE

Gliclazidă, studiu clinic, voluntari sănătoși, analiza farmacocinetică non-compartimentală, analiza farmacocinetică compartimentală, analiza bioechivalenței, analiza statistică, evaluarea siguranței, efectul alimentelor, corelări *in vitro-in vivo*, HPLC, MS

INTRODUCERE

Întreaga lume se confruntă cu o incidență crescută a diabetului zaharat de tip 2 datorită îmbătrânirii populației, stilului de viață occidental, urbanizării, care duc la apariția obezității, modificări ale dietei și adoptarea unui stil de viață sedentar. Incidența diabetului de tip 2 a crescut dramatic. Diabetul zaharat este asociat cu un număr mare de complicații cronice, al căror rezultat final este scăderea calității vieții și a mortalității premature.

Tratamentul se bazează pe tratament non-farmacologic (exerciții fizice și dietă) și tratament farmacologic. Agenții hipoglicemianți cei mai frecvent utilizați sunt sulfonilureele. Gliclazida, o sulfoniluree de generație doi, sub formă de comprimate cu eliberare modificată, menține controlul glicemic pe o perioadă de 24 de ore, cu puține efecte adverse raportate și este bine tolerată de către pacienți.

Agenții hipoglicemianți orali și insulina sunt în general disponibili doar în câteva din țările cu venituri mici. Sunt necesare intervenții politice și programe pentru îmbunătățirea accesului echitabil. Prin înregistrarea produselor generice, mai mulți pacienți ar avea acces la tratament adecvat la costuri mai mici.

În prima parte a tezei de doctorat, intitulată *Stadiul actual al cunoașterii*, se prezintă sinteza informațiilor disponibile cu privire la principalele subiecte abordate în cadrul cercetării. Primul subiect este diabetul zaharat, cu aspectele sale generale, prevalența, factorii de risc, prevenția, diagnosticul și tratamentul și impactul economic al acestei boli. Apoi, este prezentată gliclazida cu farmacodinamia sa și mecanismul de acțiune, contraindicații, atenționări și precauții de utilizare, efecte adverse și proprietăți farmacocinetice. Cerințele de reglementare pentru efectuarea studiilor de bioechivalență și metodele utilizate pentru estimarea parametrilor farmacocinetici sunt prezentate în următoarele capitole. Un alt subiect de interes au fost metodele de stabilire a corelațiilor *In Vitro - In Vivo* (IVIVC) și aplicabilitatea acestora.

CONTRIBUȚII PERSONALE

O nouă formulare generică cu eliberare modificată cu gliclazidă 60 mg a fost dezvoltată de Ranbaxy Laboratories Limited, acum Sun Pharmaceutical Industries Limited, India. Scopul cercetării a fost de a evalua biodisponibilitatea produsului atât în condiții de repaus alimentar, cât și în condiții post-prandiale, profilul farmacocinetic care

descrie cel mai bine disponibilitatea gliclazidei în organism și de a dezvolta o corelare *in vitro-in vivo* cu datele experimentale obținute pentru acest produs.

Primul studiu al secțiunii *Contribuții personale* descrie metoda bioanalitică pentru determinarea gliclazidei din plasmă utilizând gliclazida D4 ca standard intern. Metoda a fost elaborată și validată în conformitate cu cerințele de reglementare. În timpul validării, s-a stabilit că curba de calibrare a gliclazidei este liniară de la 5.00 ng/mL la 5016.48 ng/mL, cu o limită de cuantificare de 5.00 ng/ml. Pentru evaluarea preciziei și acurateței s-a constatat o corelație bună ($R^2 = 0.9972$). Metoda necesită volume mici de probă, a avut o sensibilitate bună, curba de calibrare a fost liniară în intervalul de concentrație dorit și timpul de analiză/probă a fost scurt (2,5 min). Metoda bioanalitică a fost utilizată pentru a determina concentrațiile de gliclazidă în peste 2000 de probe de plasmă colectate din două studii de bioechivalență în care a fost evaluată formularea cu eliberare modificată cu gliclazidă 60 mg dezvoltată de Ranbaxy Laboratories Limited, acum Sun Pharmaceutical Industries Limited, India.

Cel de-al doilea studiu prezintă rezultatele unui studiu clinic de bioechivalență în condiții de repaus alimentar. Studiul a fost randomizat, încrucișat, cu două tratamente care a comparat biodisponibilitatea noului produs dezvoltat cu produsul disponibil pe piață. După obținerea concentrațiilor plasmatice de gliclazidă din plasma, au fost evaluați prin analiză noncompartimentală parametrii farmacocinetici relevanți, iar valorile medii obținute pentru acești parametrii au fost similari între cele două produse. După analiza statistică efectuată prin testul ANOVA, pentru C_{max} și AUC_{0-t} , raportul mediilor produsului test și referință și intervalele de încredere de 90% au fost în intervalul stabilit de bioechivalență de 80.00-125.00%.

În **cel de-al treilea studiu** sunt prezentate rezultatele studiului de bioechivalență în condiții post-prandiale. Design-ul studiului a fost similar cu cel prezentat anterior și s-a folosit aceeași metodologie. Rezultatele au arătat valori medii similare pentru parametrii farmacocinetici obținuți pentru ambele produse. Mai mult, criteriile de bioechivalență au fost îndeplinite pentru cele două produse testate în condiții post-prandiale.

Având în vedere rezultatele studiilor în condiții de repaus alimentar și post-prandiale în conformitate cu cerințele de reglementare, se poate concluziona că produsele testate sunt bioechivalente și interschimbabile. Chiar dacă evaluarea siguranței nu a fost un obiectiv al acestor studii, evenimentele adverse au fost monitorizate și s-a concluzionat că produsul a fost în general bine tolerat.

Cel de-al patrulea studiu al secțiunii *Contribuții personale* descrie evaluarea suplimentară a efectului alimentelor asupra farmacocineticii formulării nou dezvoltate. S-a observat o scădere a valorilor C_{max} și AUC_{0-t} , cu toate acestea s-a constatat că nu este semnificativă din punct de vedere statistic. Prin urmare, alimentația nu au influențat biodisponibilitatea generală a gliclazidei. Având în vedere rezultatul acestei evaluări, acest produs poate fi administrat indiferent de momentul ingestiei alimentelor. Mai mult, prin deconvoluție matematică a fost obținută fracția relativă absorbită în timp a

gliclazidei de la locul de administrare. A fost observat un timp de latență de aproximativ 2.5 ore după administrarea produsului, ceea ce ar putea fi explicat prin dezintegrarea lentă a formulării farmaceutice și golirea gastrică bifazică sau absorbția gliclazidei din două locuri distincte din tractul gastrointestinal superior.

Cel de-al cincilea studiu a urmărit elucidarea modelului farmacocinetic de bază al gliclazidei după administrarea orală în doză unică a formulării cu eliberare modificată cu gliclazidă 60 mg. Prin utilizarea metodelor specifice de analiză compartimentală, a fost determinat și descris modelul reprezentativ. Acesta sugerează o absorbție mixtă a gliclazidei, atât după o cinetică de ordin 1 cât și după o cinetică de ordin zero, proces care începe după aproximativ 3 ore după administrarea dozei. Gliclazida prezintă distribuție bicompartimentală (compartimentul central și periferic legat de procesele de distribuție de ordin 1) și cinetica de ordinul 1 pentru procesul de eliminare.

Cel de-al șaselea studiu a urmărit să evalueze o posibilă corelație *in vitro-in vivo* pentru gliclazidă. Prin urmare, testele de dizolvare *in vitro* pentru gliclazida 60 mg s-au efectuat în trei medii diferite de dizolvare: pH 4.5 tampon de acetat de sodiu, pH 6.8 tampon fosfat și pH 7.2 tampon fosfat. Cele mai bune profiluri de dizolvare au fost obținute în mediile de dizolvare cu pH 6.8 și pH 7.2, în timp ce în mediul de dizolvare cu pH 4.5 s-a observat o eliberare incompletă a gliclazidei ($69,3\% \pm 3,7\%$ eliberată în 24 de ore) sau instabilitatea substanței active la pH acid. După ce s-a luat în considerare timpul ca factor de scalare, s-a constatat corelații de nivel A ($R^2 > 0.98$ pentru cele șase corelări *in vitro- in vivo* pentru gliclazidă). Corelările *in vitro- in vivo* obținute nu au fost intenționate a fi cu scop industrial, totuși, având în vedere rezultatul preliminar al acestui studiu, s-ar putea efectua teste suplimentare pentru validarea nivelului A de corelare *in vitro- in vivo* pentru gliclazidă de 60 mg și luat în considerare posibilității aplicării unui biowaiver în cazul modificărilor ulterioare aprobării produsului.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

Principalele contribuții ale tezei constau în principal în caracterizarea adecvată în ceea ce privește biodisponibilitatea și farmacocinetica a noii formulări generice cu eliberare modificată cu gliclazidă 60 mg, dezvoltată de Ranbaxy Laboratories Limited, acum Sun Pharmaceutical Industries Limited, India.

Biodisponibilitatea și farmacocinetica au fost evaluate în comparație cu un produs de referință disponibil pe piață, prin intermediul a două studii de bioechivalență în condiții de repaus și post-prandiale. Cele două produse s-au dovedit a fi bioechivalente, astfel încât noul produs cu eliberare modificată ar putea fi înregistrat pentru obținerea autorizației de introducere pe piață. Mai mult, produsul a demonstrat un profil de siguranță favorabil.

Pentru a evalua concentrațiile plasmatice ale gliclazidei din probele de plasmă provenite din studiile menționate mai sus, a fost elaborată și validată o nouă metodă

bioanalitică. Metoda este simplă, nu necesită costuri ridicate, are o bună sensibilitate și respectă cerințele de reglementare.

Studiul efectului alimentelor asupra biodisponibilității nu a evidențiat nici o influență, astfel încât produsul poate fi administrat indiferent de momentul aportului alimentelor, crescând astfel complianța pacienților și aderarea la tratament.

Profilul farmacocinetic de bază al gliclazidei a fost evaluat și constă în: două compartimente (central și periferic), proces mixt de absorbție (cinetică de ordinul 1 și zero), cu un timp de latență de aproximativ 3 ore și cinetică de ordinul 1 al eliminării.

Au fost stabilite șase nivele liniare de corelare *in vitro- in vivo* pentru produsul nou dezvoltat, pentru teste de dizolvare efectuate la pH 4.5, 6.8 și 7.2. Cercetarea ar putea fi extinsă pentru a stabili metoda de dizolvare discriminatorie, validarea metodei, utilizarea acestei abordări pentru controlul calității produsului și scutirea de la studii suplimentare în cazul în care sunt necesare modificări după aprobarea produsului. Corelările *in vitro- in vivo* ar putea fi scalate în continuare la nivel industrial și ar putea fi folosite pentru a obține un biowaiver.

Prin înregistrarea produsului generic, comprimate cu eliberare modificată cu gliclazidă 60 mg, impactul economic al tratamentului diabetului de tip 2 ar putea fi redus. În plus, mai mulți pacienți ar avea acces la un tratament adecvat, iar complianța la tratament ar putea fi crescută datorită simplității regimului de dozare și a profilului de toleranță bun.

PhD THESIS SUMMARY

Pharmacokinetics and bioavailability of gliclazide modified release formulations

PhD student **Diana Ioana Pop**

PhD supervisor Prof.dr. **Laurian Vlase**

CLUJ-NAPOCA 2019



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HATIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
ACTUAL STATE OF KNOWLEDGE	
1. Managing diabetes	17
1.1. Diabetes mellitus - General aspects	17
1.2. Types of diabetes	17
1.3. Prevalence of diabetes	18
1. 4. Risk factors	18
1. 5. Prevention	19
1. 6. Diagnosis and treatment	19
1. 7. Economic impact of diabetes	20
2. Gliclazide	21
2. 1. Pharmacodynamics and mechanism of action	21
2.1.1. Effects on insulin release	21
2.1.2. Extra-pancreatic effects	21
2.1.3. Other actions	22
2. 2. Contraindications, special warnings and precautions for use	22
2.2.1. Hypoglycaemia	22
2.2.2. Poor blood glucose control	23
2.2.3. Laboratory tests	23
2. 3. Adverse effects	23
2.3.1. Hypoglycaemia	24
2.3.2. Other adverse events	24
2. 4. Pharmacokinetic properties	25
2.4.1. Absorption, distribution, biotransformation and elimination	25
2.4.2. Linearity/non-linearity	26
2.4.3. Effect of food	26
2.4.4. Special populations	26
2. 5. Interactions	26
2.5.1. Drug-drug interactions	26
2.5.2. Drug-lifestyle interactions	26
3. Comparative bioavailability	27
4. Pharmacokinetic analysis	31
4.1. Noncompartmental pharmacokinetic analysis	31
4.2. Compartmental pharmacokinetic analysis	33
5. <i>In Vitro</i> – <i>In Vivo</i> correlation models	35
5.1. IVIVC Levels	35
PERSONAL CONTRIBUTION	39
1. Background/Objectives	39
2. General methodology	41
2.1. Study design	41
2.2. Subject sample size	42
2.3. Inclusion criteria for subjects	43
2.4. Drug administration	44
2.5. Study standardization	44
2.6. Safety	44

2.7. Blood samples collection and processing	45
3. Study 1. Bioanalytical method for determination of Gliclazide plasma concentrations	47
3.1. Introduction	47
3.2. Objectives	
3.3. Materials and Methods	47
3.3.1. Instrumentation	48
3.3.2. Reagents and materials	48
3.3.3. Standard solutions	48
3.3.4. Samples processing	48
3.3.5. Chromatographic conditions	49
3.3.6. Method validation	49
3.4. Results	49
3.5. Discussion	53
3.6. Conclusion	53
4. Study 2. Bioequivalence of two formulations of Gliclazide 60 mg modified release tablets in a randomized crossover study in healthy Caucasian subjects under fasting condition	55
4.1. Introduction	55
4.2. Objectives	55
4.3. Materials and Methods	55
4.3.1. Subjects	55
4.3.2. Study design	55
4.3.3. Bioanalytical methods	56
4.3.4. Pharmacokinetics and statistical analysis	56
4.4. Results	56
4.5. Discussions	79
4.6. Conclusions	79
5. Study 3. Bioequivalence of two formulations of Gliclazide 60 mg modified release tablets in a randomized crossover study in healthy Caucasian subjects under fed condition	81
5.1. Introduction	81
5.2. Objectives	81
5.3. Materials and Methods	81
5.3.1. Subjects	81
5.3.2. Study design	81
5.3.3. Bioanalytical methods	82
5.3.4. Pharmacokinetics and statistical analysis	82
5.4. Results	82
5.5. Discussions	93
5.6. Conclusions	94
6. Study 4. Effect of food on the pharmacokinetics of Gliclazide 60 mg modified release tablet in healthy Caucasian volunteers	95
6.1. Introduction	95
6.2. Objectives	95
6.3. Materials and Methods	95

6.3.1. Pharmacokinetics and statistical analysis	96
6.3.2. Safety evaluation	96
6.4. Results	96
6.4.1. Subjects	96
6.4.2. Pharmacokinetic analysis	97
6.4.3. Statistical analysis	99
6.4.4. Safety evaluation	99
6.5. Discussions	100
6.6. Conclusions	101
7. Study 5. Pharmacokinetics of gliclazide after single dose oral administration of Gliclazide 60 mg modified release tablet	103
7.1. Introduction	103
7.2. Objectives	103
7.3. Materials and Methods	104
7.3.1. Subjects	104
7.3.2. Study design	104
7.3.3. Bioanalytical analysis	104
7.3.4. Pharmacokinetic compartmental analysis	104
7.4. Results	108
7.5. Discussions	112
7.6. Conclusions	112
8. Study 6. <i>In Vitro</i> – <i>In Vivo</i> correlations for gliclazide 60 mg modified release tablets	113
8.1. Introduction	113
8.2. Objectives	114
8.3. Materials and Methods	114
8.3.1. <i>In vivo</i> data	114
8.3.2. <i>In vitro</i> studies	114
8.3.3. <i>In vitro-in vivo</i> correlation	115
8.4. Results	115
8.4.1. <i>In vivo</i> data	115
8.4.2. <i>In vitro</i> data	115
8.4.3. <i>In vitro-in vivo</i> correlation	116
8.5. Discussions	119
8.6. Conclusions	120
9. General conclusions	121
10. Originality and innovative contributions of the thesis	123
REFERENCES	125

KEYWORDS

Gliclazide, clinical study, healthy volunteers, pharmacokinetic non-compartmental analysis, pharmacokinetic compartmental analysis, bioequivalence analysis, statistical analysis, safety evaluation, food effect, *in vitro-in vivo* correlations, HPLC, MS

INTRODUCTION

The whole world faces an increased incidence of type 2 diabetes due to population aging, occidental lifestyle, urbanization, resulting in development of obesity, changes in diet and adoption of a sedentary lifestyle. The incidence of type 2 diabetes increased dramatically. Diabetes mellitus is associated with a large number of chronic complications whose end result is decreased quality of life and premature mortality

The treatment is based on non-pharmacological treatment (exercise and diet) and pharmacological treatment. The hypoglycemic agents that are the most frequently used are sulfonylureas. Gliclazide, second-generation sulphonylurea, as modified release tablets, maintains the glycemic control over 24 hours, with few reported adverse effects and is well tolerated by the patients.

In only a few of low-income countries, oral hypoglycaemic agents and insulin are generally available. There are required policy and programme interventions for improvement of equitable access. By registration of generic products, more patients would have access to appropriate treatment at lower costs.

In the first part entitled *Actual state of knowledge* of the PhD thesis there is presented the synthesis of the available information with respect to the main topics addressed in the research. First topic is the diabetes mellitus with its general aspects, prevalence, risk factors, prevention, diagnosis and treatment and the economic impact of this disease. Next, it is presented Gliclazide with its pharmacodynamics and mechanism of action, contraindications, warnings and precautions for use, adverse effects and pharmacokinetic properties. The regulatory requirements for conducting bioequivalence studies and the methods used for the estimation of pharmacokinetic parameters are presented in the following chapters. Another topic of interest were the methods for establishing *In Vitro – In Vivo* correlations (IVIVC) and their applicability.

PERSONAL CONTRIBUTION

A new generic modified release formulation with Gliclazide 60 mg was developed by Ranbaxy Laboratories Limited, now Sun Pharmaceutical Industries Limited, India. The aim of the research was to evaluate the bioavailability of the product in both fasted and fed conditions, the pharmacokinetic profile that best describes the disposition of Gliclazide in the body and to develop an *in vivo-in vitro* correlation with the experimental data obtained with this product.

The **first study** from the *Personal contribution* part describes the bioanalytical method for determination of Gliclazide in plasma using Gliclazide D4 as internal standard. The method was developed and validated in compliance with the regulatory requirements. During the validation step, the calibration curve of gliclazide was found to be linear from 5.00 ng/mL to 5016.48 ng/mL, with a quantification limit of 5.00 ng/mL. For the precision and accuracy assessment, a good correlation was found ($R^2=0.9972$). The method required small samples volumes, had a good sensitivity, the calibration curve was linear over the required concentration range and the run time was short (2.5 min). The bioanalytical method was used to determine the levels of gliclazide in more than 2000 plasma samples collected from two bioequivalence studies for Gliclazide 60 mg modified release formulation developed by Ranbaxy Laboratories Limited, now Sun Pharmaceutical Industries Limited, India.

The **second study** presents the results of a bioequivalence clinical trial under fasting conditions of subjects, a two-way crossover randomized study that compared the bioavailability of the new developed product with the product available on market. After obtaining the Gliclazide plasma concentrations from the biological samples, the relevant pharmacokinetic parameters were evaluated by non-compartmental analysis method and the mean values obtained for the pharmacokinetic parameters were similar between the two products. After statistical analysis performed by ANOVA test, for C_{max} and AUC_{0-t} the ratio of test and reference product averages and the 90% confidence intervals were within 80.00-125.00% acceptance bioequivalence range.

In the **third study** are presented the results of the bioequivalence test under fed conditions of subjects. The study design was similar with that under fasting condition and the same methodology was used. The results showed similar mean values for the obtained pharmacokinetic parameters of both gliclazide products. Furthermore, the bioequivalence criteria was met for the two products tested in fed conditions.

Taking into consideration the results of the studies in fasting and fed condition according to the regulatory requirements, it can be concluded that the tested products are bioequivalent and interchangeable. Even though safety evaluation was not an objective of these studies, the adverse events were monitored and it was concluded that the product was generally well tolerated.

The **fourth study** of the *Personal contribution* section describes the additional evaluation of food effect on the pharmacokinetics of the newly developed formulation. A decrease was observed for C_{max} and AUC_{0-t} , however it was found to be not statistically significant. Therefore, food had no influenced upon the overall exposure to gliclazide. Considering the result of this evaluation, this product can be administered irrespective to food intake. Further, by mathematical deconvolution was obtained the relative fraction absorbed over time of gliclazide from the site of administration. A T_{lag} of 2.5 hours was observed after administration of the product, which could be explained by slow disintegration of the pharmaceutical formulation in addition to the biphasic gastric

emptying or absorption of gliclazide from two distinct sites within the upper gastrointestinal tract.

The **fifth study** aimed to elucidate the basic pharmacokinetic model of gliclazide after single oral administration of 60 mg gliclazide modified release formulation. By using the specific compartmental analysis methods, the representative model was determined and described. The model (M10) considers a mix order absorption for gliclazide, 1st order and zero order kinetics, which begins after approximately 3 hrs post-dose. Gliclazide displayed bicompartamental distribution (central and peripheral compartment linked by the 1st order distribution processes) and 1st order kinetics for the elimination process.

The **sixth study** aimed to evaluate a possible *in vitro-in vivo* correlation for gliclazide. Therefore, *in vitro* dissolution tests for Gliclazide 60 mg were carried out in three different dissolution media: pH 4.5 sodium acetate buffer, pH 6.8 phosphate buffer, and pH 7.2 phosphate buffer. The best dissolution profiles were obtained in dissolution media of pH 6.8 and pH 7.2, whereas in dissolution media of pH 4.5, it was observed an incomplete release of gliclazide (69.3 % ± 3.7 % released in 24 hours) or instability of the active molecule at acidic pH. After the time scaling factor was considered for the modified release product, level A correlation was found ($R^2 > 0.98$ for the six IVIVC of gliclazide). The obtained IVIVCs were not meant to be scaled up at industrial level, however considering the preliminary result of this study, additional tests could be performed in order to validate the level A IVIVC for gliclazide 60 mg and further consider of applying for a biowaiver in case of post-approval changes of the product.

ORIGINALITY AND INOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE THESIS

The main contribution of the thesis is the proper characterization in terms of bioavailability and pharmacokinetics of the new generic modified release formulation of gliclazide 60 mg, developed by Ranbaxy Laboratories Limited, now Sun Pharmaceutical Industries Limited, India.

The bioavailability and pharmacokinetics were evaluated in comparison with a reference product available on market, through two bioequivalence studies under fasting and fed condition. The two products were found to be bioequivalent, thus the newly developed modified release product could be registered for obtaining the marketing authorization. Moreover, the product proved a favourable safety profile.

In order to evaluate the plasma concentrations of gliclazide from plasma samples for the above mentioned studies, a new bioanalytical method was developed and validated. The method is simple, does not require high costs, has a good sensitivity and complies with the regulatory requirements.

The food effect study revealed no influence of food on the product bioavailability so the product can be administered irrespective to food intake, hence increasing the patients' compliance and adherence to treatment.

The basic pharmacokinetic profile of gliclazide was evaluated and it consists of two compartments (central and peripheral), mixed order absorption process (1st and zero order kinetics) with a lag time of around 3 hrs, and 1st order kinetics of elimination.

Six linear level A IVIVCs were established for the newly developed gliclazide 60 mg modified release tablets, for dissolution tests performed at pH 4.5, 6.8 and 7.2. The research could be extended to establish the discriminating dissolution method, validate the method, use this approach to quality control of the product, and exempt from additional studies in case changes are required after product approval. The IVIVCs could be further scaled-up at industrial level and be used to obtain a biowaiver.

By registration of the generic product, the economical burden could be reduced for patients under medical treatment for type 2 diabetes and further have positive implications in pharmacotherapy. In addition, more patients would have access to appropriate treatment and the compliance to treatment could be increased due to the simplicity of the dosing regimen and a good tolerance profile of Gliclazide 60 mg modified release tablets.