

© Коллектив авторов, 2017

Д. В. Рейхарт¹, В. С. Арнаутов², А. А. Глобенко², А. В. Капашин²,
А. В. Белостоцкий¹, Д. К. Васильев³

БИОДОСТУПНОСТЬ И ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ТАБЛЕТОК ТЕРАЛИДЖЕН® РЕТАРД И ТЕРАЛИДЖЕН® ВАЛЕНТА ПРИ ОДНОКРАТНОМ ПРИЕМЕ ЗДОРОВЫМИ ДОБРОВОЛЬЦАМИ

¹ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

² ПАО «Валента Фарм», Россия, 119530, Москва, ул. Генерала Дорохова, д. 18, стр. 2.

³ ФГБУ «ГНИЦ ПМ» Минздрава России, Россия, 101990, Москва, Петроверигский переулок, д. 10, стр. 3.

Сравнение биодоступности и фармакокинетики таблеток пролонгированного действия, покрытых пленочной оболочкой, Тералиджен® ретард, 20, 40 и 60 мг и таблеток, покрытых пленочной оболочкой, Тералиджен® Валента, 5 мг в дозе 20 мг, выполнено в ходе двойного слепого рандомизированного плацебо-контролируемого исследования с однократным приемом здоровыми добровольцами таблеток, покрытых пленочной оболочкой, Тералиджен® Валента, 5 мг (в дозе 20 мг), а также таблеток пролонгированного действия, покрытых пленочной оболочкой Тералиджен® ретард, 20, 40 и 60 мг (в дозе 20, 40 и 60 мг, соответственно). Относительная биодоступность таблеток пролонгированного действия, покрытых пленочной оболочкой, Тералиджен® ретард, составила (отношение геометрических средних (GMR) [90 % CI]) для дозы 20 мг — 80,95 % [62,65 – 104,74 %]; для дозы 40 мг — 214,33 % [165,64 – 277,34 %]; для дозы 60 мг — 394,77 % [305,08 – 510,83 %]. При изучении зависимости «доза — концентрация» коэффициент линейности для показателя C_{max} составил 0,1902 нг/мл/мг, для показателя AUC_{0-t} — 4,6087 ч · нг/мл/мг. Учитывая вышеприведенные данные, исследуемые фармакокинетические параметры можно считать линейно зависящими от принятой дозы в изученном диапазоне доз (20 – 60 мг). Оценка ретардации таблеток пролонгированного действия, покрытых пленочной оболочкой, Тералиджен® ретард, 20, 40 и 60 мг основана на сравнении показателя среднего времени удержания препарата в организме (MRT). Значение MRT для ретардированной лекарственной формы на 144,18, 157,40 и 156,30 % (для дозировок 20, 40 и 60 мг, соответственно) превосходило MRT препарата с немедленным высвобождением. По результатам проведенного исследования можно сделать заключение, что таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой, Тералиджен® ретард, 20, 40 и 60 мг, обладают пролонгированным фармакокинетическим профилем относительно препарата Тералиджен® Валента, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 5 мг и прогнозируемой дозозависимостью.

Ключевые слова: Тералиджен® ретард; Тералиджен® Валента; AUC ; C_{max} ; $T_{1/2}$; биодоступность; фармакокинетика; фаза I клинических исследований.

Тералиджен® Валента (алимемазина тартрат) применяется как средство, оказывающее антипсихотическое, седативное, противорвотное действие, что позволяет назначать его у пациентов с неврозами, неврозоподобными состояниями, при психопатиях, тревожно-депрессивных состояниях и нарушении сна различного генеза. Эти эффекты обусловлены тем, что алимемазин блокирует D_2 -рецепторы мезолимбической и мезокортикальной системы, препятствует проведению сигналов к адренорецепторам ретикулярной формации и ингибирует рецепторы триггерной зоны рвотного центра [1 – 9].

При приеме внутрь алимемазин быстро и полностью всасывается из желудочно-кишечного тракта. Связывание с белками плазмы составляет 20 – 30 %.

Выводится препарат и его метаболиты почти полностью с мочой в течение 48 часов [1].

Экспериментальная часть

Проведенное исследование являлось двойным слепым, рандомизированным, плацебо-контролируемым с однократным приемом исследуемого препарата в 4 периодах.

Проведение исследования одобрено Министерством здравоохранения РФ, Советом по этике при Министерстве здравоохранения РФ и Локальным этическим комитетом исследовательского центра. Исследование проводилось в соответствии с действующим законодательством РФ, Хельсинкской декларацией и принципами надлежащей клинической практики, утвержден-

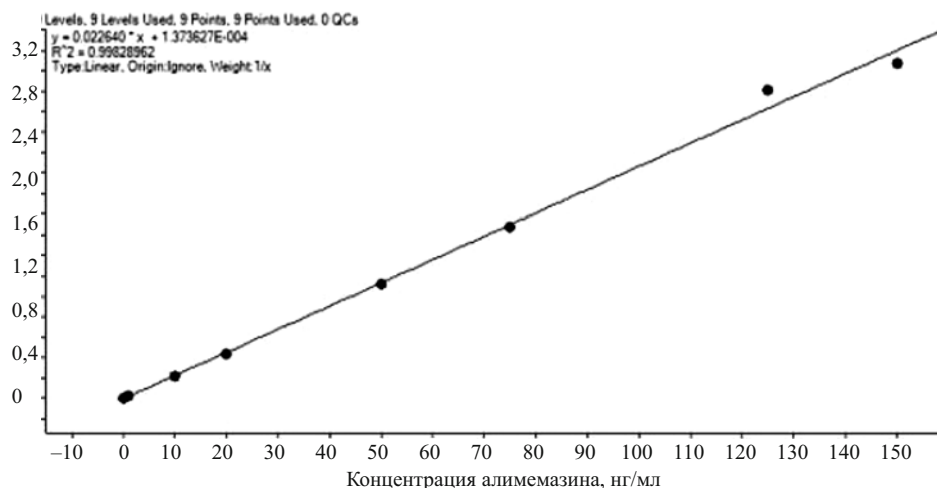


Рис. 1. Калибровочная кривая алимемазина в плазме крови человека, аналитическая серия № 1 ($N = 1$)

ными Международной конференцией по гармонизации технических требований к регистрации фармацевтических продуктов, предназначенных для применения человеком (ICH GCP).

В исследование включали здоровых добровольцев, подписавших письменное информированное согласие и отвечавших критериям включения и исключения, типичным для клинического исследования с участием здоровых добровольцев.

Популяция исследования составила 28 здоровых добровольцев мужского ($n = 23$) и женского ($n = 5$) пола со следующими демографическими и антропометрическими данными (Min – Max [Mean]): возраст 19 – 41 [29,71] год; масса тела 54,5 – 93,9 [74,86] кг; рост 159 – 188 [177,21] см; индекс массы тела 19,0 – 29,6 [23,76] кг/м².

Добровольцы были распределены в 2 группы. Добровольцы, рандомизированные в первую группу ($n = 25$), однократно последовательно принимали препарат Тералиджен® Валента, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 5 мг в дозе 20 мг, и Тералиджен® ретард, таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой, 20, 40 и 60 мг в дозе 20, 40 и 60 мг, соответственно. Добровольцы, рандомизированные во вторую группу ($n = 3$), принимали плацебо препаратов Тералиджен® Валента, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 5 мг и Тералиджен® ретард, таблетки пролонгированного действия, покрытые пле-

ночной оболочкой, 20, 40 и 60 мг в эквивалентном количестве.

В каждом из 4 периодов участников исследования госпитализировали в стационар на срок 60 ч (12 ч до и 48 ч после приема исследуемого препарата).

Прием исследуемого препарата осуществлялся утром после 10-часового периода воздержания от приема пищи. Стандартный ужин все участники эксперимента получали при госпитализации в исследовательский центр, а также стандартный завтрак, обед и ужин — спустя 4, 6 и 10 ч от момента приема исследуемого препарата. В дальнейшем пищевой режим был свободный.

Продолжительность периода “отмывания” между приемами исследуемого препарата в каждом периоде составляла (6 ± 1) дней.

В рамках данного исследования участники эксперимента принимали следующие исследуемые препараты:

- препарат Тералиджен® Валента, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 5 мг, производства ПАО “Валента Фарм”;
- плацебо препарата Тералиджен® Валента, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 5 мг, производства ПАО “Валента Фарм”;
- препарат Тералиджен® ретард, таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой, 20, 40 и 60 мг, производства ПАО “Валента Фарм”;

Таблица 1
 Описательная статистика фармакокинетических параметров таблеток, покрытых пленочной оболочкой, Тералиджен® Валента, 5 мг

Параметр	Mean	SD	Min	Median	Max	Geo Mean	Q25	Q75
AUC_{inf} , ч · мкг/мл	66,60	35,90	19,47	67,01	155,43	58,15	38,07	85,05
AUC_{0-48} , ч · нг/мл	59,86	29,09	17,91	60,95	126,03	53,07	35,11	78,99
C_{max} , нг/мл	4,94	2,02	1,76	4,86	9,53	4,55	3,19	6,14
$T_{1/2}$, ч	12,57	3,74	5,72	12,62	23,79	12,07	9,80	13,48
K_{cl} , 1/ч	0,06	0,02	0,03	0,05	0,12	0,06	0,05	0,07
MRT , ч	12,47	2,09	7,56	12,74	16,95	12,29	10,99	13,59
T_{max} , ч	3,44	1,39	1,00	3,00	7,00	3,16	2,00	4,50

– плацебо препарата Тералиджен® ретард, таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой, 20, 40 и 60 мг, производства ПАО “Валента Фарм”.

С целью соблюдения маскировки плацебо полностью копировали массу, размер, внешний вид, первичную и вторичную упаковки, а также маркировку препаратов Тералиджен® Валента и Тералиджен® ретард.

В ходе исследования в каждом из 4 периодов приема исследуемого препарата взятие образцов крови объемом 6 мл осуществлялось в стерильные, вакуумные одноразовые пластиковые пробирки с К₂ЭДТА до приема исследуемого препарата (проба “0”), далее спустя 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 12; 24; 36 и 48 ч после приема исследуемого препарата (всего 15 проб в рамках каждого периода).

Каждый образец крови непосредственно после взятия охлаждали, и спустя не более чем 30 мин от момента его взятия помещали в центрифугу для дальнейшего центрифугирования в течение 10 мин при скорости вращения ротора 3000 об/мин и ускорении 1400 G при температуре от +4 до +8 °С. Полученная таким образом плазма разделялась на 2 по возможности равные аликвоты объемом не менее 0,5 мл. Далее образцы помещали на хранение в низкотемпературную морозильную камеру, где хранили в течение 4 мес при температуре не выше –65 °С до момента доставки в аналитическую лабораторию. При хранении размораживания/повторного замораживания образцов не допускалось.

Расчет основных фармакокинетических параметров, включавших в себя максимальную концентрацию препарата (C_{max}), время достижения максимальной

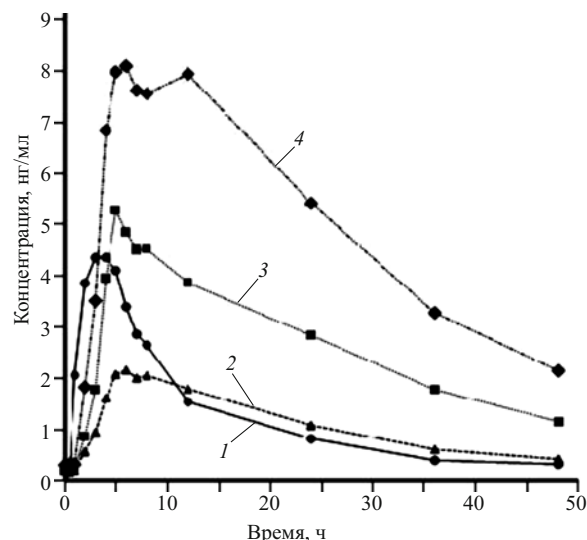


Рис. 2. Усредненные фармакокинетические профили исследуемых лекарственных препаратов: 1 — Тералиджен® Валента, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 5 мг; 2 — Тералиджен® ретард, таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой, 20 мг; 3 — Тералиджен® ретард, таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой, 40 мг; 4 — Тералиджен® ретард, таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой, 60 мг.

концентрации (T_{max}), площадь под фармакокинетической кривой (AUC), период полуэлиминации ($T_{1/2}$), среднее время удержания препарата в организме (MRT), общий клиренс (Cl_t) и объем распределения (V_d) выполняли с помощью пакета статистических программ Phoenix WinNonlin 6.3.

Оценку относительной биодоступности провели вычислением 90 % доверительных интервалов (ДИ)

Таблица 2

Описательная статистика фармакокинетических параметров таблеток пролонгированного действия, покрытых пленочной оболочкой, Тералиджен® ретард, 20 мг

Параметр	Mean	SD	Min	Median	Max	Geo Mean	Q25	Q75
AUC_{inf} , ч · мкг/мл	64,61	42,49	14,92	53,96	171,39	53,18	30,47	82,62
AUC_{0-48} , ч · нг/мл	51,75	31,08	12,61	47,19	124,31	42,96	23,31	74,09
C_{max} , нг/мл	2,62	1,35	0,72	2,33	4,98	2,24	1,19	3,85
$T_{1/2}$, ч	15,77	4,07	10,85	14,67	25,25	15,32	12,92	17,63
K_{el} , 1/ч	0,05	0,01	0,03	0,05	0,06	0,05	0,04	0,05
MRT , ч	17,92	2,50	10,05	18,79	20,55	17,71	16,68	19,70
T_{max} , ч	6,68	2,69	3,00	6,00	12,00	6,23	5,00	8,00

Таблица 3

Описательная статистика фармакокинетических параметров таблеток пролонгированного действия, покрытых пленочной оболочкой, Тералиджен® ретард, 40 мг

Параметр	Mean	SD	Min	Median	Max	Geo Mean	Q25	Q75
AUC_{inf} , ч · мкг/мл	166,97	83,22	48,25	157,58	349,55	145,41	107,17	245,81
AUC_{0-48} , ч · нг/мл	126,52	55,07	44,55	134,14	236,29	113,75	78,35	179,89
C_{max} , нг/мл	5,89	2,57	1,58	5,04	10,64	5,28	3,74	8,43
$T_{1/2}$, ч	18,65	8,08	9,88	15,81	47,09	17,39	13,69	21,21
K_{el} , 1/ч	0,04	0,01	0,01	0,04	0,07	0,04	0,03	0,05
MRT , ч	19,53	2,75	13,22	19,61	26,68	19,34	17,35	21,31
T_{max} , ч	7,84	6,60	2,00	5,00	36,00	6,50	5,00	10,00

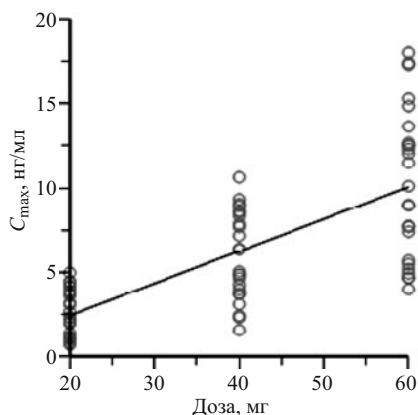


Рис. 3. График зависимости показателя C_{\max} от принятой перорально дозы препарата Тералиджен® ретард.

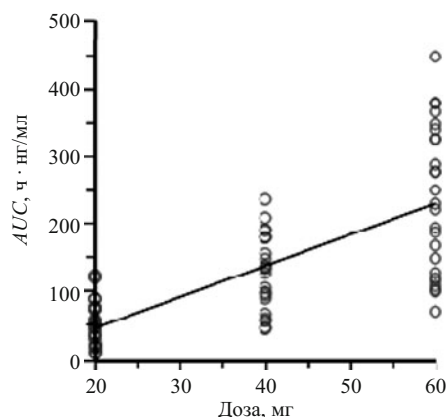


Рис. 4. График зависимости показателя AUC_{0-t} от принятой перорально дозы препарата Тералиджен® ретард.

для отношений средних геометрических анализируемых параметров: AUC_{0-t} — площадь под фармакокинетической кривой, начиная с нулевого значения времени (момент приема препарата), до времени отбора последнего образца крови (48 ч) и C_{\max} — максимальная концентрация препарата в плазме крови.

Аналитический метод. Извлечение алимемазина из плазмы проводили экстракцией этилацетатом с упариванием в токе азота, разведением и последующим его определением с помощью ВЭЖХ — МС/МС системы.

Для анализа тестируемого соединения и внутреннего стандарта (ВС) в пробах разработан ВЭЖХ метод с масс-спектрометрическим (МС/МС) детектированием в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) с регистрацией наиболее интенсивных и специфичных переходов для алимемазина $299,1 > 100,1 m/z$, для ВС алимемазин-d6 $305,2 > 106,2$ [10, 11].

Детектирование исследуемых веществ проводили при ионизации в электроспрее в режиме регистрации положительных ионов. Хроматографическое разделение осуществляли на колонке Waters Acquity UPLC VEN C18, $2,1 \times 50$ мм, 1,7 мкм в градиентном режиме элюирования при скорости потока 0,4 мл/мин. В качестве внутреннего стандарта использовали алимемазин-d6. В этих условиях время удерживания алимемазина составило 0,71 мин, алимемазина-d6 — 0,71 мин. Общее время анализа — 3 мин.

В качестве ВС использовали алимемазин-d6, близкий к аналиту по хроматографическим и экстракционным свойствам и не интерферирующий с ним.

Концентрацию аналитов рассчитывали из калибровочной зависимости отношения площади хроматографического пика каждого аналита к пику ВС от номинальной концентрации аналита.

Калибровочные кривые представляли собой линейные функции с нормированием $1/x$.

Таблица 4

Описательная статистика фармакокинетических параметров таблеток пролонгированного действия, покрытых пленочной оболочкой, Тералиджен® ретард, 60 мг

Параметр	Mean	SD	Min	Median	Max	Geo Mean	Q25	Q75
AUC_{inf} , ч · мкг/мл	298,18	154,89	74,24	292,93	597,52	256,05	139,56	429,37
AUC_{0-48} , ч · нг/мл	236,09	108,95	70,51	229,92	447,92	209,50	123,83	333,34
C_{\max} , нг/мл	10,23	4,41	4,00	10,11	18,00	9,25	5,59	13,16
$T_{1/2}$, ч	17,43	5,39	9,32	16,29	30,73	16,70	13,63	21,48
K_{el} , 1/ч	0,04	0,01	0,02	0,04	0,07	0,04	0,03	0,05
MRT , ч	19,32	2,07	12,71	19,66	23,07	19,20	18,18	20,59
T_{\max} , ч	7,48	3,37	4,00	6,00	12,00	6,79	5,00	12,00

Таблица 5

Значение оцененных 90 % ДИ для AUC_{0-48} таблеток Тералиджен® ретард после перорального введения

Препарат	GMR, %	ДИ 90 %		Мощность
		нижняя граница	верхняя граница	
Тералиджен® ретард, 20 мг	80,95	62,56	104,74	0,41
Тералиджен® ретард, 40 мг	214,33	165,64	277,34	0,41
Тералиджен® ретард, 60 мг	394,77	305,08	510,83	0,41

Препарат	GMR, %	ДИ 90 %		Мощность
		нижняя граница	верхняя граница	
Тералиджен® ретард, 20 мг	49,27	38,89	62,42	0,46
Тералиджен® ретард, 40 мг	116,16	91,69	147,16	0,46
Тералиджен® ретард, 60 мг	203,46	160,59	257,77	0,46

* GMR, верхняя и нижняя граница 90 % ДИ округлены до 2-го знака после запятой.

Валидация аналитического метода. Биоаналитический метод, используемый для определения алимемазина в плазме, был надлежащим образом валидирован и документирован в соответствии с рекомендациями Bioanalytical Method Validation — FDA. Валидация методики включала в себя определение следующих параметров: степень извлечения соединений из плазмы и матричный эффект; нижний предел количественного определения (НПКО); калибровочный диапазон; точность и прецизионность метода; специфичность метода; перенос пробы; стабильность соединения.

НПКО алимемазина в плазме крови человека составил 0,1 нг/мл при соотношении сигнал/шум более 10. Калибровочная кривая представляла собой линейную зависимость с коэффициентом корреляции не менее 0,99 в диапазоне концентраций 0,1 – 150 нг/мл (рис. 1).

Исследование свойств алимемазина показало его стабильность в плазме и основных растворах при 3-кратном размораживании/замораживании. Аналит также был стабилен в плазме и рабочих растворах при краткосрочном хранении при комнатной температуре. Пост-препаративное и долгосрочное хранение растворов алимемазина в течение нескольких дней при 4 °C также не выявило существенной деградации соединения.

Таким образом, вышеперечисленные характеристики разработанного метода делают его пригодным для количественного определения алимемазина в плазме крови человека при исследовании фармакокинетики и биоэквивалентности.

Результаты и их обсуждение

По полученным данным о концентрации исследуемых препаратов в запланированных временных точках были рассчитаны их фармакокинетические показатели, а также проведена оценка относительной биодоступности препарата Тералиджен® ретард в сравнении с препаратом Тералиджен® Валента.

Расчет фармакокинетических показателей проведен по данным добровольцев, получивших исследуемые препараты (группа 1, $n = 25$). Данные субъектов, получивших плацебо (группа 2, $n = 3$) в расчетах не использовались.

Фармакокинетические профили исследуемых препаратов представлены на рис. 2 и в табл. 1 – 4.

Результаты расчета 90 % ДИ для отношений геометрических средних (GMR) AUC_{0-48} и C_{\max} ретардированного препарата относительно препарата немедленного высвобождения представлены в табл. 5 и 6.

Относительная биодоступность препарата Тералиджен® ретард, таблетки пролонгированного действия, составила (GMR [90 % CI]) для дозировки 20 мг — 80,95 % [62,65 – 104,74 %]; для дозировки 40 мг — 214,33 % [165,64 – 277,34 %]; для дозировки 60 мг — 394,77 % [305,08 – 510,83 %]. При изучении зависимости “доза — концентрация” коэффициент линейности для показателя C_{\max} составил 0,1902 нг/мл/мг, для показателя AUC_{0-t} — 4,6087 ч · нг/мл/мг. Зависимость фармакокинетических показателей AUC_{0-t} и C_{\max} от принятой дозы препарата Тералиджен® ретард представлена на рис. 3 и 4. Учитывая вышеприведенные данные, исследуемые фармакокинетические параметры можно считать линейно зависящими от принятой дозы в изученном диапазоне доз (20 – 60 мг). Оценка ретардации препарата Тералиджен® ретард, таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой 20 мг, 40 мг и 60 мг основана на сравнении показателя MRT . Значение MRT для ретардированной лекарственной формы на 144,18, 157,40 и 156,30 % (для дозировок 20, 40 и 60 мг, соответственно) превосходило MRT препарата с немедленным высвобождением.

По результатам проведенного исследования можно сделать заключение, что препарат Тералиджен® ретард, таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой, 20, 40 и 60 мг, обладает пролонгированным фармакокинетическим профилем и прогнозируемой дозозависимостью в сравнении с фармакокинетическим профилем препарата Тералиджен® Валента, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 5 мг.

ЛИТЕРАТУРА

1. ПАО “Валента Фарм”, *Утвержденная Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения с Изменениями № 1 Тералиджен® Валента*, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 5 мг. РУ № 000642 от 28 сентября 2011, Москва (2011); доступно по адресу: <http://www.grls.rosminzdrav.ru>.
2. Б. В. Андреев, *Обзор психиатрии и мед. психологии им. В. М. Бехтерева*, 2(2), (2005).
3. S. Courvoisier, R. Ducrot, J. Fournel, et al., *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **115**, 90 (1958).
4. A. Fernandez-Zoila, *Sem Hop.*, **37**, 1355 – 1357 (1961).

5. G. Iosse, M. Lavuane, *Le Tartrate d'alimemazine in ambulatory psychiatric practice*, Gasette Med. (France), 2, 193 (1961).
6. B. Naviau, F. Fouche, J. Serret, *Ann. Med. Psychol.*, 119 (1961).
7. В. В. Калинин, *Соц. и клин. психиатр.*, 3(2), 143 – 147 (1993).
8. Т. А. Немчин, Ю. Я. Тупицын, *Вопросы психиатрии и невропатол.*, 11, 218 – 230 (1961).
9. В. М. Шаманина, Г. И. Завидовская, *Ж. невропатол. и психиатр.*, № 2, 1741 – 1745 (1964).
10. Д. В. Рейхарт, Г. И. Барам, Е. Д. Гольдберг и др., *Фарматека*, № 2 (98), 77 – 78 (2005).
11. В. С. Арнаутов, Д. В. Рейхарт, А. С. Борисов, *Хим.-фарм. журн.*, 51(7), 8 – 12 (2017).

Поступила 25.07.17

BIOAVAILABILITY AND PHARMACOKINETIC PARAMETERS OF TERALIGEN RETARD AND TERALIGEN VALENTA TABLETS UPON SINGLE ADMINISTRATION BY HEALTHY VOLUNTEERS

D. V. Reikhart¹, V. S. Arnautov², A. A. Globenko², A. V. Kapashin², A. V. Belostotskii¹, and D. K. Vasil'ev³

¹ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991 Russia

² Valenta Pharm Company, Moscow, 119530 Russia

³ National Medical Research Center for Preventive Medicine, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 101990 Russia

A comparison of the bioavailability and pharmacokinetic parameters of film-coated Teraligen Retard (TR 20, 40, and 60 mg) and usual film-coated Teraligen Valenta (TV 5 mg, in a dose of 20 mg) tablets has been performed on the basis of double blind randomized placebo-controlled investigations involving single administration in healthy volunteers. The relative bioavailability (ratio of geometric mean 90% CI values) of TR 20, 40, and 60 mg tablets amounted to 80.95% [62.65 – 104.74%], 214.33% [165.64 – 277.34%], and 394.77% [305.08 – 510.83%] for 20, 40, and 60 mg tablets, respectively. Analysis of the dose – concentration relationship showed that the linearity coefficient amounted to 0.1902 ng/(mL mg) for C_{max} index and 4.6087 (h ng)/(mL mg) for AUC_{0-t} . The obtained data show that these pharmacokinetic parameters can be treated as linearly dose-dependent in the range studied (20 – 60 mg). Evaluation of the delay of drug release from film-coated TR 20, 40, and 60 mg tablets was based on comparison of the mean retention time (MRT) of drug in the organism. The MRT values of 20, 40, and 60 mg TR tablets were 144.18, 157.40, and 156.30%, respectively, and exceeded the MRT of drug from immediate-release TV tablets. Based on the results of this investigation, it is concluded that TR 20, 40, and 60 mg tablets exhibit prolonged drug release profile (as compared to that of TV 5 mg tablets) and are characterized by predictable dose-dependent bioavailability.

Keywords: teraligen retard; teraligen Valenta; AUC ; C_{max} ; $T_{1/2}$; bioavailability; pharmacokinetics; clinical investigation; stage I.