



Facultad de Farmacia

Grado en Farmacia

Estudios de Bioequivalencia del Clonazepam aplicados a la Industria Farmacéutica

Memoria de Trabajo Fin de Grado

San Juan de Alicante

Junio de 2018

Autor: Manuel Rodes García

Modalidad: Experimental

Tutor/es: María Isabel González Álvarez
Marta González Álvarez

ÍNDICE

Resumen

1. Introducción y antecedente

1.1. Absorción Intestinal de fármaco

1.2. Clasificación biofarmacéutica

1.2.1. Definición del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica

1.2.2. Solubilidad

1.2.3. Permeabilidad

1.2.4. Velocidad de disolución

1.3. Bioequivalencia y bioexenciones

1.3.1. Bioequivalencia

1.3.2 Bioexenciones

1.4. Ensayos de disolución

1.5. Medios de disolución

1.6. Tipos de medios

1.6.1. Medios estándar

1.6.2. Fluido intestinal

1.6.3. Medios preparados con tensioactivos sintéticos

1.7. Clonazepam

1.7.1. Propiedades fisicoquímicas

1.7.2. Farmacocinética

2. Objetivo

3. Materiales y Métodos

3.1. Compuestos ensayados

3.2. Ensayo de disolución

3.3. Comparación de perfiles de disolución

3.4. Análisis

4. Resultados y discusión

4.1. Validación de la técnica analítica

4.2. Perfiles de disolución

4.2.1. Perfiles de disolución a pH 1.2, 4.5, y 6.8

4.2.2. Perfiles de disolución a pH 6.8 con LSS al 0.1%

4.2.3. Perfiles de disolución a pH 6.8 con Tween 20 al 0,2%

5. Conclusiones

6. Bibliografía

Resumen

Mediante el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (BCS) es posible clasificar los fármacos en 4 grupos según la solubilidad y la permeabilidad del fármaco. Esta clasificación permite que a determinados fármacos de clase I y III se les pueda aplicar la bioexención, en cambio fármacos de clase II no se les puede aplicar bioexención pero se pueden realizar estudios de disolución *in vitro* como herramienta biopredictiva.

Esto resulta ser de gran interés para la industria farmacéutica en la elaboración de especialidades genéricas, ya que desarrollando nuevos medios de disolución *in vitro* se puede predecir lo que ocurrirá *in vivo*, de esta forma se consigue reducir un gran número de estudios en humanos y el abaratamiento de los costes.

En este trabajo las formulaciones a estudiar han sido del principio activo de clonazepam tomando como referencia Rivotril®. El objetivo de este trabajo es realizar los perfiles de disolución de estas formulaciones en diferentes medios, comparar estos perfiles mediante el cálculo del factor de similitud f_2 y buscar nuevos medios que sean biopredictivos para conseguir reproducir *in vitro* los resultados de los que disponemos de los ensayos con humanos. Con el fin de comercializar medicamentos menos costosos y que estén a un precio más asequible para toda la población.

Los ensayos de disolución se llevaron a cabo con el aparato II de paletas, que permite la simulación del trato gastrointestinal a las condiciones que marcan diferentes guías regulatorias: temperatura, tiempo en disolución, pH, revoluciones por minutos.

Los perfiles de disolución obtenidos se analizaron mediante el cálculo del factor de similitud f_2 , con el que es posible comparar diferentes formulaciones. Finalmente, los datos comparados se observan diferencias entre los perfiles muy ajustado por lo que se convendría hacer algunas modificaciones al medio para que se vieran los perfiles con mayor claridad.

Introducción y antecedentes

Durante la década de los 70 a nivel mundial se produce un gran aumento de la industria del medicamento. Esto se ve reflejado en un aumento del gasto de medicamentos tanto por parte de la población como de los gobiernos que origina presiones sobre la industria farmacéutica para el control de los precios. Así es como finalmente en la década de los 80 aparecen los medicamentos genéricos, pero no es hasta 1997 cuando aparecen los primeros genéricos en España. Normalmente el medicamento innovador tiene una patente de unos 20 años desde que se lanza la patente y aproximadamente 10 desde que se empieza a comercializar, de esta forma se guarda el derecho de explotación del fármaco.

Posteriormente cuando la patente finaliza cualquier laboratorio puede solicitar la comercialización en el mercado de medicamentos genéricos con ese principio activo. Esto es muy interesante para los laboratorios genéricos, ya que demostrando que existe bioequivalencia terapéutica de su medicamento genérico respecto al medicamento de referencia ahorra muchos recursos en pruebas y estudios abaratando así la comercialización final del medicamento genérico. Además, al gobierno también le beneficia permitiendo reducir el gasto nacional en medicamentos que hace, por ello cuando una prescripción se realice por principio activo, el farmacéutico debe dispensar el medicamento de precio más bajo de su agrupación homogénea y, en el caso de igualdad, el medicamento genérico o el medicamento biosimilar correspondiente; e igualmente sucede cuando se realiza una sustitución de fármacos.⁽¹⁾

Actualmente en España para lanzar un medicamento nuevo de venta en el mercado es necesario presentar una serie de estudios y ensayos clínicos correspondientes a las diferentes fases de estudio del fármaco: la fase I que se realiza en voluntarios sanos y se centra los datos farmacológicos y toxicológicos, Fase II se realiza en voluntarios enfermos por medio de un estudio aleatorizado para conocer si el fármaco es efectivo respecto al control, Fase III se busca aumentar la población de estudio con el propósito de obtener datos que sustenten que el fármaco es seguro y eficaz o no, Fase IV es la fase continua después del proceso de comercialización del fármaco para llevar así un control de cómo está funcionando el mismo. En cada fase se centran más en una característica particular del fármaco como se muestra en la tabla 1⁽²⁾ Todas estas

fases del desarrollo del fármaco se realizan para asegurar que ese medicamento es seguro y efectivo, esos estudios posteriormente deben ser enviados a la AEMPS (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios) para que certifique que el medicamento es seguro tal y como afirman los estudios y finalmente se autorice la comercialización del medicamento.⁽³⁾

Tabla 1 Objetivos en el desarrollo de fármacos durante las distintas fases investigación

Fases de estudios clínicos	Fase I	Fase II	Fase III
Farmacocinética	3	2	1
Eficacia	1	2	3
Seguridad	3	3	3
Tamaño de muestra	1	2	3
Costo	1	2	3

En esta tabla se muestran en las que se centran durante cada fase de estudio del fármaco. Los valores que se utilizan en la tabla van de 3 a 1. Donde 3 significa que en ese campo de estudio se le da mucha importancia durante esa fase, 2 que el campo de estudio tiene algo de importancia y 1 que el campo de estudio tiene una ligera importancia.

Este es un proceso que obligatoriamente deben cumplir todos los medicamentos ya que no puede lanzarse al mercado un medicamento que no sea efectivo y seguro. Generalmente estos medicamentos suelen presentar una patente que protege la gran inversión que ha hecho el laboratorio en el desarrollo del fármaco y otorga el derecho de explotación del medicamento de referencia al laboratorio.

Se entiende como medicamento genérico: “todo medicamento que tenga la misma composición cualitativa y cuantitativa en principios activos y la misma forma farmacéutica, y cuya bioequivalencia con el medicamento de referencia haya sido demostrada por estudios adecuados de biodisponibilidad”⁽⁴⁾. Las diferentes sales, ésteres, éteres, isómeros, mezclas de isómeros, complejos o derivados de un principio activo se considerarán un mismo principio activo, a menos que tengan propiedades considerablemente diferentes en cuanto a seguridad y/o eficacia. Las diferentes formas farmacéuticas orales de liberación inmediata se considerarán una misma forma farmacéutica. El solicitante podrá estar exento de presentar los estudios de biodisponibilidad *in vivo* si puede demostrar que el medicamento genérico satisface los criterios pertinentes definidos en las correspondientes directrices detalladas.⁽⁵⁾

Por lo que si un laboratorio de genéricos quiere comercializar un medicamento genérico en un principio está obligado a presentar los estudios de biodisponibilidad *in vivo*, y únicamente estará exento de presentarlo en caso de que el medicamento genérico que quieran comercializar sea de clase I ó III y cumpla ciertos requisitos especificados en las guías regulatorias. En ese caso el laboratorio, los ensayos de bioequivalencia *in vivo* se pueden sustituir con la demostración de similitud estadística de los perfiles de disolución *in vitro*, a esto se le denomina bioexención.

Estos estudios de bioequivalencia terapéutica los realizan también los laboratorios de fármacos innovadores cuando quieren sacar una nueva forma farmacéutica de un medicamento de referencia propio.

Esto es una gran ventaja para muchos laboratorios ya que supone un gran ahorro a la hora de elaborar nuevos medicamentos y también permite el abaratamiento de los costes de fabricación permitiendo que se puedan obtener de este modo medicamentos de igual calidad que los medicamentos de referencia.

Para la elaboración de un medicamento genérico este debe cumplir 4 condiciones respecto al medicamento de referencia y son que: tenga el mismo principio, misma dosis, misma forma farmacéutica y que la equivalencia del medicamento genérico se demuestre que sea la misma que la del medicamento de referencia mediante estudios farmacocinéticos de biodisponibilidad.⁽⁶⁾

Si se cumplen estas 4 condiciones, una vez el laboratorio ha solicitado previamente la comercialización de este medicamento a la AEMPS, la AEMPS en este caso se le presenta esta información y valorará la comercialización del fármaco. Sí la AEMPS finalmente acepta la solicitud del laboratorio, el medicamento pasa a ser un medicamento autorizado por la AEMPS, en ese caso el medicamento genérico gozará de la característica de “prescribibilidad” que es una característica de todos y cada uno de los medicamentos que se autorizan a que puedan ser prescritos, por lo que el medicamento tiene una relación beneficio/riesgo positiva en las condiciones de uso autorizado. Y por otro lado tendrá la característica de “intercambiabilidad” si es bioequivalente con el medicamento de referencia y no pertenece al grupo de medicamento no intercambiables como son:

“Medicamentos biológicos”, “Medicamentos con Principios Activos de Estrecho Margen Terapéutico” “Medicamentos con Principio Activos sujetos a Especial Control Médico” y “Medicamentos para el aparato respiratorio administrados por vía inhalatoria”.⁽⁷⁾

1.1 Absorción intestinal de fármacos.

La gran mayoría de fármacos deben alcanzar circulación sistémica para ejercer su efecto terapéutico. La forma de entrada en el sistema circulatorio depende de la vía de administración que se utilice, generalmente la vía de administración más utilizada es la vía oral ya que es la vía más sencilla, cómoda y económica para la mayoría de los pacientes por lo que es importante conocer cómo funciona esta vía.⁽⁸⁾

El aparato digestivo inicia su recorrido en la boca, luego pasaría al esófago donde posteriormente el fármaco llega al estómago donde el fármaco puede estar entorno unos 20 - 30 minutos, a continuación, pasaría al intestino delgado donde se absorbe la mayor parte de fármacos. En él el fármaco está de 2-4 h. Consta de tres partes: duodeno, yeyuno e íleon. Y finalmente llegaría al intestino grueso que está formado por ciego colon y recto. Pero, además, hay que tener en cuenta que las formas de liberación controlada que permiten que las concentraciones del fármaco se mantengan durante 12h o más, esto se consigue ya que se modifica algunas características como la velocidad de absorción que hablaremos posteriormente de ello. En general el fármaco no está más de 1 o 2 días en tracto gastrointestinal.⁽⁹⁾

Para predecir o interpretar los resultados de absorción de un fármaco contenido en una formulación hay que tener en cuenta también el pH ya que como indica la tabla 2 y la tabla 3⁽¹⁰⁾ varía dependiendo de la zona del tracto digestivo por donde esté pasando el fármaco. La presencia de alimentos también modifica el pH y esto afecta a la disgregación, disolución y absorción del fármaco.

Tabla 2 pH de los diferentes tractos gastrointestinal

	pH del tracto GI en ayunas
Estómago	1-3
Intestino delgado	6.0-7.5
Intestino grueso	6.5

En esta tabla se representa los distintos valores de pH que tiene el tracto gastrointestinal en cada uno de sus partes

Tabla 3 pH del estómago según los alimentos que contenga

	Influencia de alimentos en pH del estómago
En ayunas	1-3
Comida liviana	3-4
Comidas grasas	4-6

En esta tabla se representa como cambia el pH del estómago en función de los alimentos que este contenga.

En cuanto a la absorción del fármaco hay que tener en cuenta que esta depende de:

- 1) Propiedades fisicoquímicas del fármaco como es su solubilidad acuosa; su o sus constantes de ionización, capacidad para atravesar por difusión barreras biológicas; su capacidad para interactuar con sistemas biológicos como enzimas y transportadores que pueda encontrarse durante la fase de absorción.
- 2) La forma farmacéutica que juega un papel importante en la liberación del principio activo. En ocasiones el vehículo del fármaco contiene componentes que regulan y favorecen la absorción mediada por mecanismos especializados
- 3) Las características fisiológicas del lugar de absorción como: pH, adaptaciones anatómicas que favorecen la absorción, expresión de portadores.
- 4) La forma en que el principio activo es administrado. Un claro ejemplo de ello es la velocidad y el grado de absorción del principio activo que depende de si el medicamento ha sido o no administrado junto a una comida, si se ha administrado con un volumen de agua abundante...

Un proceso muy importante en la absorción del fármaco es la disolución, la disolución es un proceso fundamental en la gran mayoría de formas farmacéuticas ya que es un elemento clave en el control de la duración del efecto del fármaco esto hace que medicamentos diferentes con el mismo principio activo o diferentes formas farmacéuticas tengan velocidades de disolución diferentes y su tiempo de acción también lo son. A su vez la disolución está íntimamente relacionada con la solubilidad mediante la ecuación de Noyes-Whitney que muestra los distintos factores que influyen en la velocidad de disolución:⁽¹¹⁾

$$\frac{\partial Q}{\partial t} = \frac{A \cdot D}{h} \cdot (C_s - C_t)$$

En esta ecuación la velocidad de disolución está representado por dQ/dt , A es el área superficial de disolución, D es el coeficiente de disolución, h es el espesor de la capa de difusión, C_s es la solubilidad del fármaco (o también se puede entender como la concentración de principio activo en la capa de difusión) y C_t es la concentración del fármaco en el medio de disolución.

Por lo que de esta ecuación se deduce que la velocidad de disolución es directamente proporcional a el área de superficie disponible, al coeficiente de disolución y a la diferencia de concentraciones de fármaco que hay entre la capa de difusión y el medio en disolución. Y a su vez es inversamente proporcional al espesor de la capa de difusión.

1.2. Clasificación biofarmacéutica.

1.2.1. Definición del sistema de clasificación Biofarmacéutica.

El sistema de clasificación biofarmacéutica que se sigue es el creado por Gordon Amidon en 1995⁽¹²⁾: "Permite diferenciar los fármacos de acuerdo a sus propiedades de solubilidad y permeabilidad, con el fin de establecer sus potenciales propiedades de absorción, tras su administración por vía extravasal, fundamentalmente por vía oral" Este sistema se centra en formas solidas orales de liberación inmediata a continuación en la tabla 4 se muestran las 4 categorías

en las que se puede clasificar el fármaco en función de su permeabilidad y su solubilidad.⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾

Tabla 4 Sistema de clasificación BCS de fármacos (12)

Sistema clasificación BCS	Alta solubilidad	Baja solubilidad
Alta permeabilidad	Clase I	Clase II
Baja permeabilidad	Clase III	Clase IV

En la tabla 4 se representa el Sistema de Clasificación BCS de Gordon Almidon que clasifica a los fármacos en función de su solubilidad y permeabilidad.

1.2.2. Solubilidad

En cuanto a la solubilidad de los fármacos la Agencia Europea del Medicamento (EMA) establece que para que un fármaco tenga un perfil alto de solubilidad, la dosis máxima unitaria que se puede administrar se debe disolver por completo en 250 ml de tampón entre unos rangos de pH de 1 – 6.8 y a una temperatura de 37 ± 1 °C. Hay que destacar que para esta demostración se requiere que se haga al menos con 3 tampones diferente que se encuentre en esos rangos y que preferiblemente sean de pH 1.2, 4,5 y 6,8. A parte también se exige que se compruebe el pH del medio tanto antes como después de añadir el fármaco al tampón.⁽¹⁵⁾

Por otra parte, la Food and Drug Agency exige lo mismo que la EMA solo que en este caso el rango de tampón pH es más amplio y establece que para que el fármaco sea considerado de alta solubilidad su dosis máxima unitaria se debe disolver en 250 ml de tampón ajustado a un pH entre 1,0 y 8,0.⁽¹³⁾

1.2.3. Permeabilidad

Para la demostración de que la permeabilidad es alta la EMA exige que el grado de absorción del fármaco debe ser igual o mayor al 85%. Además, la absorción completa está relacionada con una alta permeabilidad y esta debe estar justificada en estudios seguros en humanos con datos absolutos de biodisponibilidad y balance de masas.⁽¹⁵⁾

En cuanto a la FDA exige que los fármacos de alta permeabilidad son aquellos que tienen un grado de absorción mayor del 90% ante la ausencia de inestabilidad documentada en el sistema gastrointestinal o que su permeabilidad se ha determinado de forma experimental.

A partir de los datos que se han comentado anteriormente se conoce que la solubilidad y la permeabilidad son los principales procesos que limitan la absorción del fármaco. Por tanto, conociendo la clasificación biofarmacéutica BCS es posible predecir cual será el proceso limitante en la absorción de cada clase de fármaco. En la clase I al ser una clase con buena absorción debido a su alta solubilidad y permeabilidad el único paso limitante sería el vaciado gástrico. En la clase II al tener una baja solubilidad y alta permeabilidad, la disolución y la velocidad de disolución es un factor limitante ya que limita la velocidad con la que se absorbe el fármaco. En la clase III se tratan de fármacos cuya solubilidad es alta y su permeabilidad baja por lo que la permeabilidad sería el factor limitante. Y por último la clase IV al tener una baja solubilidad y permeabilidad cualquiera de los 2 procesos puede ser un proceso limitante.⁽¹³⁾

1.2.4 Velocidad disolución

La clasificación del sistema BCS se basa en solubilidad y permeabilidad, pero es necesario destacar que la velocidad de disolución va a influir en la absorción final del fármaco y puede ser un factor limitante. El sistema BCS establece que las formas farmacéuticas tienen una disolución muy rápida cuando se disuelve un 85% del fármaco en 15 minutos y que es de disolución rápida cuando se disuelve un 85% del fármaco en 30 minutos utilizando un aparato II (de paletas) a una velocidad de agitación de un 50 rpm, con un volumen de 900 ml o menor, a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ y en unos medios de tampón de: tampón HCl a pH 1,2, tampón Acetato pH 4,5 y tampón fosfato pH 6,8.⁽¹⁵⁾

1.3. Bioequivalencia y bioexenciones

1.3.1. Bioequivalencia

Los ensayos de bioequivalencia son ensayos clínicos que buscan comprobar la similitud de biodisponibilidad (tanto en velocidad como en magnitud) de un principio activo en 2 o más formulaciones farmacéuticas. Si se concluye que ambas formulaciones son bioequivalentes se asume que tanto su seguridad como eficacia serán las mismas y por tanto el medicamento puede ser intercambiable.

La absorción de un fármaco con una forma de dosificación sólida tras la administración oral depende de la liberación del principio activo desde su forma de dosificación, de la disolución del fármaco en fluidos biológicos, del lugar de absorción y de la permeabilidad del principio activo a través de las membranas biológicas del tracto gastrointestinal.⁽¹⁶⁾ Debido a que la liberación del principio activo desde la forma de dosificación y la disolución del fármaco en fluidos biológicos son pasos críticos, la disolución *in vitro* puede ser relevante para predecir el comportamiento *in vivo* de fármacos.⁽¹⁷⁾

Generalmente, es necesario realizar estudios *in vivo* para determinar el comportamiento de los medicamentos en el organismo. Se recomienda un estudio *in vivo* para todas las formas farmacéuticas sólidas que sean aprobadas después de 1962 y para productos farmacéuticos con una biodisponibilidad irregular aprobados antes de 1962.

Sin embargo, hay casos en los que se puede otorgar la exención de estudios *in vivo*, de forma que la equivalencia terapéutica se documente mediante ensayos de disolución "*in vitro*" (bioexención).⁽¹⁵⁾

1.3.2. Bioexenciones

El estudio de bioexención se puede definir como la alternativa al estudio de bioequivalencia *in vivo* mediante la demostración de equivalencia terapéutica *in vitro* para un conjunto de fármacos que cumplen con los requisitos señalados por el sistema BCS.⁽¹⁸⁾

No todos los fármacos pueden solicitar la bioexención ya que las agencias reguladoras como la EMA y la FDA piden una serie de requisitos para admitir la bioexención como sustituto del ensayo de *bioequivalencia in vivo*.

La EMA acepta como bioexención a los fármacos de liberación inmediata de clase I y clase III que cumplan los siguientes requisitos:

Los fármacos de clase I deben demostrar que tienen una solubilidad muy rápida o rápida *in vitro* tanto en la formulación test como la de referencia y sus excipientes que puedan afectar a su biodisponibilidad deben ser los mismos tanto cuantitativa como cualitativamente en cantidades similares.

Los fármacos de clase III deben demostrar que tienen una solubilidad muy rápida *in vitro* tanto en la formulación test como la de referencia y sus excipientes que puedan afectar a su biodisponibilidad deben ser los mismos tanto cuantitativa como cualitativamente en cantidades muy similares.

Además, se establece que los ensayos se deben de realizar en un rango de pH de 1 - 6,8 (al menos 1.2, 4.5 y 6.8) y es necesario estudios adicionales que aseguren el cumplimiento de un mínimo de solubilidad.⁽¹⁵⁾

1.4. Ensayo de disolución

Los ensayos de disolución se realizan para: documentar la equivalencia terapéutica de determinados productos farmacéuticos, guiar el desarrollo de nuevas formulaciones, evaluar la calidad lote a lote de un producto farmacéutico, controlar procesos garantizando la calidad de los productos y asegurar la continuidad de la calidad del producto y su comportamiento tras efectuar cambios posteriores a la aprobación o detectar bioinequivalencias.⁽¹⁸⁾ Los ensayos de disolución se han de realizar en aparatos homologados como es el aparato II (paletas) y el aparato IV (celda de flujo).⁽¹³⁾

El aparato II está compuesto de un baño termorregulado en el que se disponen 7 vasos con un volumen de 1 L. Cada uno de estos vasos en su eje central tiene una paleta que se mueve simulando los movimientos intestinales. Además, este aparato dispone de unas aberturas en la parte superior que permite el acceso para tomar muestras en función del volumen de muestras que se requiera.

Las muestras obtenidas son posteriormente valoradas con el fin de conocer la concentración y cantidad de fármaco que se ha disuelto en el medio en el tiempo que se ha muestreado el fármaco. En el aparato II solo se puede utilizar un medio por ensayo, mientras que en el aparato IV es posible cambiar el medio de disolución durante el propio ensayo esto permite que el ensayo se replique con más exactitud ya que los medios de disolución cambian como cambiarían en el tubo digestivo.

1.5. Medios de disolución

Para que un fármaco se absorba a través de la mucosa intestinal es necesario que esté disuelto. Es por ello que la velocidad de disolución y la solubilidad son parámetros determinantes a la hora de definir el comportamiento *in vivo* del fármaco. Por todo esto es necesario que los ensayos de disolución se realicen bajo ciertas condiciones que simulen el tracto gastrointestinal.

Para conocer cómo se va a comportar un fármaco *in vivo* es necesario desarrollar y trabajar en un medio biopredictivo que se ajuste a las características fisicoquímicas del fármaco y a la fisiología del tracto gastrointestinal.

1.6. Tipos de medios

1.6.1 Medios estándar

En lo referente a los medios de disolución, la FDA afirma que los ensayos se deben hacer a diferentes pH como son: pH 1,2 utilizando 0,1 N de HCL o si no Fluido Gástrico Simulado USP^(1*) sin enzimas. A pH 4,5 utilizando un tampón de acetato sódico y ácido acético. Y a pH 6,8 usado un tampón de fosfato monobásico de potasio e hidróxido de sodio o si no usar un Fluido Intestinal Simulado USP sin enzimas. Todo este ensayo sugiere que se realice con un volumen de 500 mL o si no a un volumen de 900 mL pero con una adecuada justificación.⁽²⁰⁾

1* United States Pharmacopeia, quiere decir siguiendo los criterios que indica la farmacopea estadounidense

Por otra parte, la EMA afirma los medios estándares de disolución tienen que ser a pH 1,2 utilizando 0,1 N de HCL o si no Fluido Gástrico Simulado sin enzimas. A pH 4,5 utilizando un tampón de acetato sódico y ácido acético. Y a pH 6,8 usado un tampón de fosfato monobásico de potasio e hidróxido de sodio o si no usar un Fluido Intestinal Simulado sin enzimas. Además, la EMA no permite que el medio contenga surfactante (como puede ser LSS o Tween) en los medios de ensayo, normalmente los surfactantes se utilizan para fármacos que tienen una baja solubilidad. En cuanto al volumen de medio que se utiliza la EMA mantiene que el volumen de medio que se utilice debe ser de 900 ml o menor.⁽¹⁵⁾

Es necesario destacar que los medios estándar que recomienda tanto la FDA como la EMA en algunas ocasiones no permiten predecir el comportamiento *in vivo* de los diferentes fármacos, ya que en los medios intestinales el pH no es el único parámetro que influye, si no también influyen los alimentos que se han ingerido, osmolaridad, viscosidad, fuerza iónica, y tensión superficial. Por ello también existen otros medios que tienen en cuenta más parámetros y que permiten reproducir con mayor exactitud el medio gástrico e intestinal en diferentes condiciones.

1.6.2. Fluido intestinal

Debido a que los medios establecidos por la FDA y la EMA, en ocasiones no son capaces de predecir el comportamiento *in vivo* de los fármacos, son necesarios medios más específicos capaces de ser biopredictivos.

Un ejemplo de ello es el medio FaSSIF que se caracteriza por ser un medio que simula el fluido del intestino delgado en estado de ayunas. Además de tener un pH similar al que se puede encontrar en el duodeno e íleon, también contiene componentes habituales en el intestino delgado como son las sales biliares (taurocolato sódico) y fosfolípidos (lectina) estos componentes ayudan a mejorar la solubilidad y humectación de compuestos sólidos lipófilos.⁽²¹⁾ En la siguiente tabla se describe mejor los componentes del medio FaSSIF para 500 ml un pH de 6,5 a 270 mOsm.⁽²²⁾

Tabla 5 Componentes del medio FaSSIF(22)

Componentes de FaSSIF pH 6.5 (270 mOsm)	Unidades
Taurocolato sódico (mM)	3 mM
Léctina (mM)	0.75 mM
NaOH	0.174 gr
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	1.977 gr
NaCl	3.093 gr

En la tabla 5 se describen los componentes del medio FaSSIF

Estos medios son caros y de compleja elaboración, pero podrían predecir el comportamiento *in vivo* de fármacos que tienen baja solubilidad con mayor fiabilidad. Además de este medio se están probando diferentes versiones de él mediante la adición de más ácidos biliares para ver si así mejoraría la disolución de diferentes fármacos en el cómo son la carbamazepina, ketoconazol y nifedipino.^{(23) (24)}

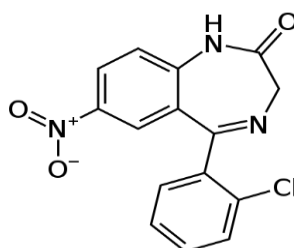
1.6.3. Medios preparados con tensioactivos sintéticos

Los tensioactivos o emulgentes son sustancias sintéticas que producen un aumento de la tensión superficial entre 2 líquidos generalmente inmiscibles. Los tensioactivos se clasifican mediante el Método Griffin en la escala HLB que va de más lipófilo (antiespumantes) a hidrófilos (solubilizantes). Para preparar medios con tensioactivos interesa que los tensioactivos sean hidrófilos, ya que estos tensioactivos son humectantes y actúan como solubilizantes.⁽²⁵⁾ Algunos tensioactivos de este tipo son el Tween 20 y el laurilsulfato sódico, estos se suelen añadir en el ensayo de fármacos de baja solubilidad para aumentar así la solubilidad del fármaco. Es importante destacar que hay que hacer un uso racional y crítico de los tensioactivos ya que un exceso de ello pueda dar demasiada solubilidad al fármaco.⁽²⁶⁾

1.7. Clonazepam

El clonazepam es un fármaco que produce todos los efectos farmacológicos característicos de las benzodiazepinas: sedante, ansiolítico miorrelejante y anticonvulsivante y estabilizador del ánimo. Igual que sucede con el resto de las benzodiazepinas tales efectos son fundamentalmente a la inhibición postsináptica mediada por el GABA. Algunos estudios realizados con animales ponen de manifiesto un efecto del clonazepam sobre la serotonina.

Figura 1: Estructura química de clonazepam



De acuerdo con datos obtenidos en animales y estudios de electroencefalograma realizado en humanos, el clonazepam reduce rápidamente muchos tipos de actividad paroxística: de descarga de puntas y ondas en las crisis de ausencia típicas (pequeño mal), onda y puntas lentas, ondas y puntas generalizadas, puntas de localización temporal o de otro tipo y onda y puntas irregulares. A parte y de acuerdo con estos resultados el clonazepam ejerce efectos favorables tanto en las epilepsias generalizadas como en las epilepsias focales.⁽²⁷⁾

1.7.1. Propiedades Fisicoquímicas

El clonazepam es un polvo cristalino, ligeramente amarillo. A continuación, en la siguiente tabla se muestran algunas de sus principales características químicas.

Tabla 6 Características fisicoquímicas de clonazepam (28) (29)

Características fisicoquímicas del clonazepam	
Fórmula química	C ₁₅ H ₁₀ N ₃ ClO ₃
Nombre IUPAC	5-(2-clorofenil)-1,3-dihidro-7-nitro-2H-1,4-benzodiazepina-2-ona
Peso molecular	315,715g/mol
pKA	11.89
Solubilidad en agua	0.0106 mg/ml
Estado	Sólido
Temperatura de fusión	239°C
Coeficiente de partición LogP	2.41

En la tabla 6 se indican las diferentes características fisicoquímicas que tiene la molécula de clonazepam

1.7.2. Farmacocinética

El clonazepam tiene una absorción rápida y casi total, es una benzodiazepina con tiempo de vida media intermedio que fluctúa entre las 30 y las 40 horas. Tiene un tiempo de absorción medio de unos 25 min. Las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan al cabo de 1 – 4 horas. La biodisponibilidad absoluta por vía oral es del 90%, el tiempo medio de distribución es de 30 min a 1 hora. El volumen de distribución es de 3L/Kg y su grado de unión a proteínas está entorno al 82-86%.

El clonazepam se metaboliza mayoritariamente por vía hepático por la reducción a 7-amino-clonazepam y por N-acetilación a 7-acetamino-clonazepam. El citocromo hepático C-450 3A4 está implicado en la nitrorreducción del clonazepam a sus metabolitos farmacológicamente inactivos. Los metabolitos que posteriormente se encuentran en la orina se encuentran tanto como compuestos libres y conjugados (glucurónido y sulfatos).

La excreción del clonazepam se realiza mayoritariamente por vía renal entre 50-70% y entre un 10-30% en las heces. El clonazepam inalterado que se excreta por la orina es menor al 2% de la dosis administrada. El aclaramiento que tiene es del 55 ml/min. La cinética de eliminación en niños es similar a la observada en adultos.^{(27) (30)}

2. Objetivos

El objetivo del estudio es encontrar un medio de disolución ideal que pueda predecir el comportamiento *in vivo* observado en los estudios de bioequivalencia en humanos de 1 formulación genérica X frente a 2 formas farmacéuticas diferentes del fármaco de referencia, Rivotril® y Ravotril®.

Objetivos específicos:

- Realizar perfiles de disolución estándar siguiendo las indicaciones de la farmacopea, de los fármacos de referencia Rivotril® frente a la formulación Ravotril® y X® para así poder comprobar si es predecible el comportamiento *in vivo* por medio de la comparación estadística de sus perfiles.
- Comparar estadísticamente los perfiles de la formulación de referencia respecto a las otras 2, utilizando el factor de similitud f_2
- Seleccionar medios de disolución nuevos en caso de que los medios estándar no sean biopredictivos.

3. Material y Métodos

3.1 Compuesto ensayado

El compuesto a estudiar ha sido el clonazepam. Los diferentes laboratorios farmacéuticos han permitido la facilitación de muestras para poder realizar el trabajo de investigación y también la información referente a los ensayos en humanos.

En la tabla 7 se muestran los lotes con los que se trabajó, los ratios de las concentraciones máximas alcanzadas en plasma (C_{max}), las áreas bajo la curva (AUC) y sus respectivos intervalos de confianza al 90% (IC). Para aceptar la bioequivalencia los ratios de C_{max} y AUC deben ser mayores del 85% en ambos casos y los IC deben estar comprendidos entre el 80 y 125%.

Tabla 7. Lotes ensayados y resultados de los estudios de bioequivalencia en humanos.

Laboratorio	Lote	Bioequivalente en estudios en humanos	C _{max}		AUC	
			Ratio (%)	IC (%)	Ratio (%)	IC (%)
x	X	NO	130,28	(117.44;144.52)	103.03	(97.86;108.48)

En esta tabla se aprecian los datos y resultados sobre los ensayos de bioequivalencia en humanos de la formulación X

3.2. Ensayo de disolución

El ensayo fue realizado en un aparato de test USP II. Los experimentos se realizaron a una temperatura de 37°C ± 0.5, se usó un volumen de 500 ml en cada vaso para todos los medios y se utilizaban 2 comprimidos por vaso en el caso de Ravotril® y la formulación X y 1 comprimido en el caso de Rivotril®, esto se debe a que la dosis de principio activo de Ravotril® y la formulación X era de 1 mg mientras que la de Rivotril® era de 2 mg. El aparato que se utilizó fue el Pharma-Test PT-DT70. Es un aparato con 8 orificios y en 7 de estos se disponen vasos de vidrios. Los vasos de vidrio son cilíndricos y transparentes se encuentran recubiertos por un baño termostático.

Los vasos en su fondo disponen de forma semiesférica con una altura de 168 ± 8 mm y un diámetro de 102 ± 4 mm en la que puede almacenar hasta 1 litro. En la parte superior del aparato, en su cubierta se encuentran 8 ejes donde se insertan las paletas (aparato II) junto a ello también hay unas tapas de plástico, cubriendo 7 vasos, cuya función sirve para evitar que los medios se evaporen. El octavo eje, que no contiene vaso, contiene una paleta cuya función es sumergirse directamente en el agua que cubre los vasos moviendo el agua y generando un flujo para que el calor que genera el aparato sea lo más uniforme en posible en todos los vasos. Cada uno de los ejes debe coincidir con el eje vertical del vaso con un error permitido de 2 mm. Las paletas del aparato deben mantenerse a una distancia de 25 ± 2 mm del fondo del vaso y la velocidad se puede regular en dependiendo de las condiciones del ensayo que se requieran.

A la hora de realizar el ensayo se comienza preparando el medio de disolución con tampón dependiendo de las condiciones que se quieren estudiar. La composición que deben seguir los medios de disolución se describe de manera detallada en la farmacopea europea.⁽²⁹⁾

Finalizada la preparación de nuestra disolución es necesario comprobar con que esta tiene un pH óptimo mediante el pHmetro. Una vez ajustado al pH se lleva a cabo el proceso de desgasificación por medio de filtración al vacío esto se realiza mediante un filtro Milipore tipo HNWP de nylon de 0,45 µm. La desgasificación se realiza para que no haya burbujas que recubran el comprimido, reduciendo así la superficie de contacto entre el comprimido y el medio. Los medios de disolución de 500 ml se disponen en los vasos y se espera a que alcancen la temperatura óptima de $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Se introducen los comprimidos en los vasos intentando que entren todos los comprimidos a la vez en contacto con el medio al mismo tiempo y rápidamente se inicia el proceso de agitación a 50 rpm.

Los tiempos para la obtención de muestra se fijan de la siguiente forma: 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos para todos los ensayos que se van a realizar en la tabla 8 se muestran cuáles son las condiciones y todos los medios que se han utilizado para el estudio.

Tabla 8. Especificaciones del ensayo con clonazepam

Especificaciones del ensayo	
Aparato	Nº 2 (paletas)
Medios de disolución	Solución tampón a pH 1.2 a 37°C Solución tampón a pH 4.5 a 37°C Solución tampón a pH 6.8 a 37°C Solución tampón a pH 6.8 con LSS al 0.1% a 37°C a 37°C Solución tampón a pH 6.8 con Tween 20 al 0.2% a 37°C
Volumen de disolución	500 mL
Volumen de muestra	1 mL con reposición
Velocidad de agitación	50 rpm
Tiempo de muestreo	5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120
Determinación	Cromatografía Líquida de alta resolución 254 nm

En esta tabla se representa las especificaciones que se siguieron en el ensayo de clonazepam

3.3. Comparación de perfiles de disolución

En cuanto a la evaluación de la cinética de disolución del clonazepam (tanto del fármaco de referencia como el genérico) se debe hacer utilizando el factor de similitud f_2 , así es como se permiten desarrollar las correlaciones *in vitro* - *in vivo* validadas que van a permitir hacer la predicción de la concentración plasmáticas de posibles nuevas formulaciones a partir de los perfiles de disolución. La comparación de los perfiles de disolución de los fármacos se realiza mediante la comparación estadística de los perfiles utilizando el factor de similitud f_2 , que se describe en la siguiente fórmula:

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\}$$

En esta ecuación n representa el número de muestras que se han tomado para realizar el cálculo, R_t equivale al porcentaje disuelto promedio en el tiempo del fármaco de referencia y T_t se corresponde con el fármaco disuelto promedio en el tiempo t del fármaco que se está estudiando. Es importante destacar que para que los perfiles de disolución tengan la consideración de ser similares el valor de f_2 deber ser mayor o igual a 50.

3.4. Procesamiento y análisis de muestras

La obtención de muestras se llevó a cabo a los: 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos, se tomó un volumen de 1 ml y a continuación se añadió otro 1 ml al medio. Obteniendo así una dilución 1:1 posteriormente se centrifuga la muestra, para evitar que haya algún tipo de precipitado en suspensión, a continuación, se toman 500 μ L de la muestra para hacer una dilución 1:2 en metanol. La razón por la que se hace esto es porque el clonazepam es un compuesto muy insoluble en agua y tiene una solubilidad mucho mayor en metanol, se vuelve a centrifugar la muestra para evitar la formación de precipitados en suspensión y se coloca la muestra en viales.

Cuando la muestra se encuentra disuelta se procede a la determinación cualitativa del fármaco mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Este tipo de cromatografía es usada comúnmente para análisis de muestras químicas y bioquímicas.

La técnica de la cromatografía se basa en la separación de los componentes de la muestra en función de los diferentes tipos de interacción química entre la muestra que se analiza y la columna cromatográfica.

El sistema cromatográfico está compuesto de un sistema Alliance (Waters) 2695 compuesto por una bomba cuaternaria y un inyector automático, un detector de fluorescencia Waters 2475 programable y un integrador (programa Empower). La longitud de onda a la que se mide el clonazepam es de 254 nm, el volumen de inyección es de 90 μ L y su tiempo de retención de unos 2 minutos. En cuanto a las condiciones, la fase estacionaria está formada por un sistema de fase reserva compuesto por una precolumna Teknocroma TCR-C130-B, con 2 filtros de 2 μ m y relleno con micropartícula C-18 de 40 μ m de tamaño, una columna de acero inoxidable Waters modelo Nova Pak C-18 de 3.9 m de diámetro, 15 mm de longitud y tamaño de partícula de 4 μ m. La fase móvil que se ha utilizado ha sido una mezcla en proporción volumétrica de 25:75 de solución acuosa más de 1% ácido trifluoroacético y acetonitrilo

La fase móvil fue filtrada a través de un filtro Milipore tipo HNWP de nylon de 0.45 μ m de diámetro para desgasificar y eliminar todas las posibles partículas en suspensión.

4. Resultados y discusión

4.1 Validación de la técnica analítica

Las técnicas analíticas fueron validadas previamente por el equipo de investigación.

4.2 Perfiles de disolución

En los medios de todos los perfiles de disolución se utilizó un volumen de 500 ml, ya que recientemente la FDA ha cambiado sus criterios hacer sus ensayos de bioequivalencia y permite que se hagan con este volumen que es más cercano al que habría en el organismo.

4.2.1 Perfiles de disolución a pH 1.2, 4.5, y 6.8

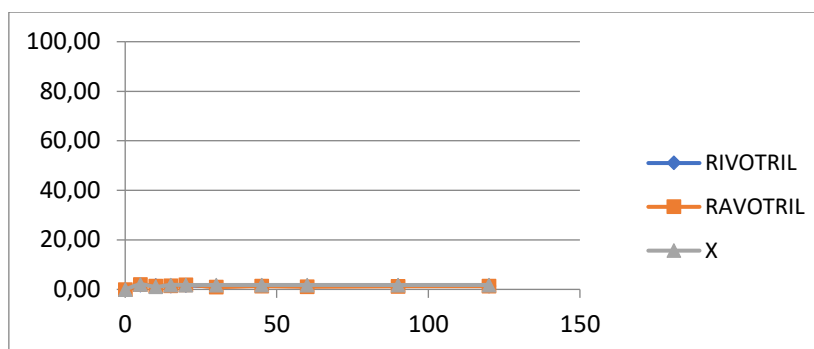
A continuación, en la tabla 9 y la figura 2 se ven los resultados en porcentaje de lo que se ha disuelto de Rivotril®, Ravotril® y la formulación X durante diferentes tiempos a pH 1,2. En la tabla 10 se indican los cálculos del factor de similitud f2 de Rivotril® frente a las formulaciones genéricas.

Tabla 9 Porcentaje disuelto de Rivotril, X y Ravotril a pH 1,2

Tiempo (min)	Rivotril			Ravotril			X		
	% disuelto	% recalculado	SD	% disuelto	% recalculado	SD	% disuelto	% recalculado	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	1,70	89,53	1,62	1,96	103,21	1,31	1,99	104,64	2,57
10	1,67	87,94	1,97	1,38	72,78	2,79	1,08	56,82	2,21
15	1,40	73,73	2,65	1,51	79,42	1,03	1,79	94,25	1,87
20	1,60	84,25	1,44	1,91	100,74	2,44	1,78	93,68	1,39
30	1,23	64,77	1,14	1,02	53,56	1,04	1,79	94,25	0,99
45	1,45	76,36	0,58	1,32	69,47	2,23	1,79	94,15	4,44
60	1,29	67,93	1,18	1,08	56,81	2,20	1,79	94,25	3,35
90	1,48	77,93	2,44	1,27	66,81	2,95	1,78	93,68	3,88
120	1,36	71,62	1,58	1,31	68,88	1,14	1,79	94,26	3,79

En la tabla 9 se representan el porcentaje de Rivotril, la formulación X y Ravotril a pH 1,2 a diferentes tiempos, el porcentaje recalculado asumiendo como máximo 100% el valor máximo de estos y su desviación estándar.

Figura 2 Representación gráfica del perfil de disolución de Rivotril, X y Ravotril a pH 1,2



En la figura 2, se representa gráficamente los perfiles de disolución de Rivotril, la formulación X y Ravotril a pH 1,2 en diferentes tiempos

Tabla 10 Calculo de f2 real y asumiendo como 100% el valor máximo de Rivotril respecto a la formulación X y Ravotril en pH 1,2

Rivotril - X				Rivotril - Ravotril			
f2 real		f2 recalculado sobre 100%		f2 real		f2 recalculado sobre 100%	
EMA	FDA	EMA	FDA	EMA	FDA	EMA	FDA
98,32	98,32	>50	33,34	99,49	99,49	46,90	46,90

En la tabla 10 se representa los resultados del cálculo del factor de similitud f2 a partir de los datos de porcentaje disuelto y el porcentaje disuelto recalculado a pH 1,2. Los resultados calculados han seguido tanto los criterios de la EMA como de la FDA

Como se puede observar los resultados de disolución a este pH son muy bajos para todas las formulaciones, ya que apenas llegan al 2%. Esto provoca que a la hora de calcular el factor de similitud salga mayor de 50 tanto Rivotril - X como para Rivotril - Ravotril pero si se hace el F2 recalculado este sale menor de 50 en ambas formulaciones por tanto estas formulaciones a pH 1,2 no serían similares.

Hay que destacar que la concentración máxima recalculado de la formulación X es mucho mayor que las concentraciones máximas de la formulación de Rivotril y Ravotril, tal y como indicaban los datos de los estudios de bioequivalencia en humanos de la formulación X, por lo que este medio biopredice que no son similares. En este caso que la concentración máxima de la formulación X sea mayor que la de referencia, no sería significativo ya que el perfil de disolución de las 3 formulaciones es muy bajo y ninguna formulación sería biosimilar a partir de los porcentajes de disolución recalculados.

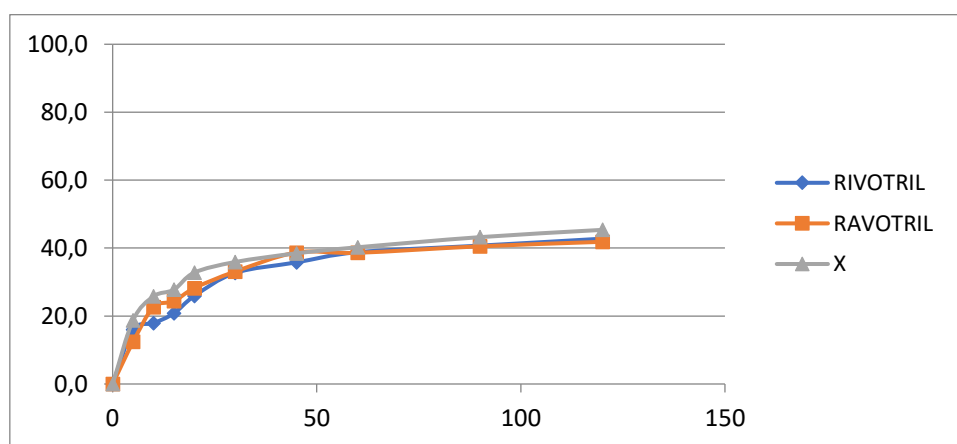
En la siguiente tabla 11 y figura 3 se muestran los porcentajes de disolución de las formulaciones Rivotril®, Ravotril® y la formulación X a diferentes tiempos a pH 4,5. La tabla 12 muestra los valores calculados del parámetro f2 de Rivotril® frente a las formulaciones genéricas.

Tabla 11 Porcentaje de Rivotril disuelto a diferentes tiempos en referencia a la formulación X y Ravotril en pH 4.5

Tiempo (min)	Rivotril			Ravotril			X		
	% disuelto	% recalculado	SD	% disuelto	% recalculado	SD	% disuelto	% recalculado	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	16,0	33,77	1,62	12,4	26,19	1,31	18,8	39,65	2,57
10	17,9	37,81	1,97	22,6	47,72	2,79	25,8	54,49	2,21
15	20,8	43,92	2,65	24,4	51,49	1,03	27,8	58,69	1,87
20	25,9	54,72	1,44	28,2	59,61	2,44	32,8	69,25	1,39
30	32,7	69,05	1,14	33,1	69,89	1,04	35,9	75,84	0,99
45	35,8	75,67	0,58	38,7	81,71	2,23	38,5	81,25	4,44
60	38,8	81,96	1,18	38,6	81,59	2,20	40,2	85,021	3,35
90	40,7	86,05	2,44	40,5	85,63	2,95	43,2	91,32	3,88
120	42,8	90,40	1,58	41,8	88,42	1,14	45,4	95,86	3,79

En la tabla 11 se representan el porcentaje de Rivotril, la formulación X y Ravotril a pH 4,5 a diferentes tiempos, el porcentaje recalculado asumiendo como máximo 100% el valor máximo de estos y su desviación estándar.

Figura 3 Representación gráfica del perfil de disolución de Rivotril, la formulación X y Ravotril a pH 4,5



En la figura 3, se representa gráficamente los perfiles de disolución de Rivotril, la formulación X y Ravotril a pH 4,5 en diferentes tiempos.

Tabla 12 Calculo de f2 real y asumiendo máxima fracción 100% de Rivotril respecto a la formulación X y Ravotril en pH 4,5

Rivotril - X				Rivotril - Ravotril			
f2 real		f2 recalculado sobre 100%		f2 real		f2 recalculado sobre 100%	
EMA	FDA	EMA	FDA	EMA	FDA	EMA	FDA
66,64	66,64	46,96	48,40	78,48	78,48	61,12	61,12

En la tabla 12 se representa los resultados del cálculo del factor de similitud f2 a partir de los datos de porcentaje disuelto y el porcentaje disuelto recalculado a pH 4,5. Los resultados calculados han seguido tanto los criterios de la EMA como de la FDA.

En cuanto a los resultados obtenidos a pH 4,5 hay que destacar que el fármaco se disolvió mucho mejor que a pH 1,2 pudiéndose observar un aumento de la disolución de las 3 formulaciones llegando posteriormente a una asíntota. En la gráfica se observa como la asíntota de la formulación X está por encima del resto, esto es lógico ya que la concentración máxima de la formulación X es mayor que la de referencia. Mientras que la asíntota de Ravotril está superpuesta con la formulación de referencia, lo cual es lógico ya que son bioequivalentes.

A la hora del cálculo del factor de similitud este fue mayor de 70 para ambas formulaciones, pero el f2 recalculado es menor de 50 para las formulaciones Rivotril - X por lo que no son similares, lo cual es esperado ya que como indicaba los datos del estudio de bioequivalencia en humanos su concentración máxima es superior al del resto de formulaciones prediciendo que no son biosimilares y en este caso es significativo ya que esto hace que el f2 sea menor de 50 y por tanto Rivotril - X no sean biosimilares. Por otra parte, las formulaciones Rivotril - Ravotril dan un cálculo de f2 mayor de 50 lo cual era esperado ya que son bioequivalentes.

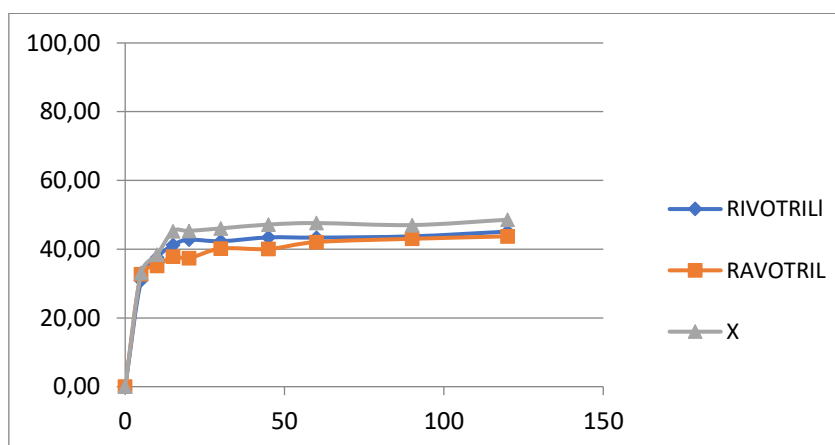
En la tabla 13 y figura 4 se observan los porcentajes de disolución para las formulaciones Rivotril®, Ravotril® y la formulación X, durante diferentes tiempos a un pH de 6,8. La tabla 14 muestra los valores de f2 de Rivotril® frente a las formulaciones genéricas

Tabla 13 Porcentaje de Rivotril disuelto a diferentes tiempos en referencia a X y Ravotril en pH 6,8

Tiempo (min)	Rivotril			Ravotril			X		
	% disuelto	% recalculado	SD	% disuelto	% recalculado	SD	% disuelto	% recalculado	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	30,95	59,75	1,62	32,77	63,27	1,31	33,09	63,89	2,57
10	37,62	72,63	1,97	35,15	67,86	2,79	38,41	74,17	2,21
15	41,24	79,62	2,65	37,86	73,10	1,03	45,22	87,32	1,87
20	42,75	82,54	1,44	37,37	72,15	2,44	45,32	87,50	1,39
30	42,33	81,72	1,14	40,18	77,58	1,04	46,06	88,93	0,99
45	43,42	83,83	0,58	40,05	77,33	2,23	47,17	91,08	4,44
60	43,37	83,73	1,18	42,08	81,24	2,20	47,60	91,91	3,35
90	43,74	84,45	2,44	43,03	83,07	2,95	47,02	90,79	3,88
120	45,12	87,11	1,58	43,74	84,46	1,14	48,58	93,80	3,79

En la tabla 13 se representan el porcentaje de Rivotril, la formulación X y Ravotril a pH 6,8 a diferentes tiempos, el porcentaje recalculado asumiendo como máximo 100% el valor máximo de estos y su desviación estándar.

Figura 4 Representación gráfica del perfil de disolución de Rivotril, la formulación X y Ravotril a pH 6,8



En la figura 4, se representa gráficamente los perfiles de disolución de Rivotril, la formulación X y Ravotril a pH 6,8 en diferentes tiempos.

Tabla 14 Calculo de f2 real y asumiendo máxima fracción 100% de Rivotril respecto a la formulación X y Ravotril en pH 6,8

Rivotril - X				Rivotril - Ravotril			
f2 real		f2 recalculado sobre 100%		f2 real		f2 recalculado sobre 100%	
EMA	FDA	EMA	FDA	EMA	FDA	EMA	FDA
72,49	72,49	45,95	57,73	77,43	77,43	63,08	64,18

En la tabla 14 se representa los resultados del cálculo del factor de similitud f2 a partir de los datos de porcentaje disuelto y el porcentaje disuelto recalculado a pH 6,8. Los resultados calculados han seguido tanto los criterios de la EMA como de la FDA

En cuanto los resultados se pueden ver en la gráfica como conforme pasa el tiempo las formulaciones se van disolviendo hasta el minuto 15 en el que prácticamente alcanza una asíntota y desde entonces la disolución de las formulaciones varía muy poco. Se puede observar como en los últimos tiempos las asíntotas de Rivotril y Ravotril se superponen mientras que la asíntota de la formulación X está ligeramente por encima, tal y como predicen los datos de los estudios de bioequivalencia en humanos, ya que la concentración máxima de formulación X es mayor que la de referencia.

En cuanto los cálculos del factor de similitud, este fue mayor de 50 para todas las formulaciones. En el cálculo del factor de similitud recalculado, las formulaciones de Rivotril y la formulación X solo son similares si se calcula siguiendo los requisitos de la FDA mientras que si se calcula con los criterios de la EMA el cálculo del factor de similitud sería menor de 50 y por tanto no serían similares. En este caso el ligero aumento de la concentración máxima que tiene la formulación X respecto al Rivotril ha sido predicho por el medio de bioensayo. Sin embargo, al calcular f2 siguiendo los criterios de la FDA sería mayor de 50 y por tanto sería biosimilar y si se siguen los criterios de la EMA el valor de f2 sería menor de 50 indicando que las 2 formulaciones son diferentes tal como se observa en los estudios *in vivo*.

Mientras por otra parte el factor de similitud recalculado para las formulaciones Rivotril - Ravotril es mayor de 50 lo que confirma que ambas formulaciones son bioequivalentes.

Estos tres medios estándar que son los que las farmacopeas, tanto europea como americana, recomiendan seguir no permiten distinguir bien entre los lotes por lo que es necesario seleccionar otros medios que proporcionen resultados biopredictivos.

4.2.2 Perfiles de disolución a pH 6,8 con LSS al 0.1%

Debido a que las diferentes formulaciones a estudiar no alcanzan un porcentaje de disolución mayor del 50% siguiendo las recomendaciones de la farmacopea europea y americana. Se procede a trabajar con medios a los que se les ha adicionado un tensioactivo para que mejore el proceso de disolución y la humectación. El primer tensioactivo que se utilizó fue laurilsulfato sódico (LSS) al 0,1%

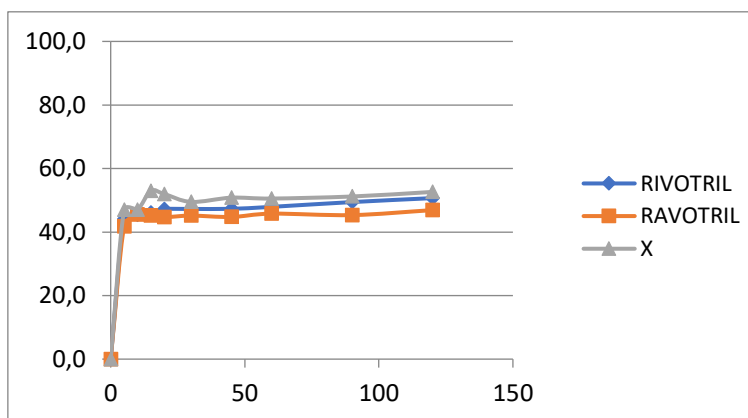
A continuación, en la tabla 15 y la figura 5 se aprecian diferentes porcentajes de disolución de las formulaciones a estudiar a diferentes tiempos y en un medio que contiene un pH de 6,5 y LSS al 0.1%. En la tabla 16 se muestran los cálculos del factor de similitud f_2 de Rivotril® frente a las formulaciones genéricas

Tabla 15 Porcentaje de Rivotril disuelto a diferentes tiempos en referencia a la formulación X y Rivotril en pH 6,5 y con LSS al 0,1%

Tiempo (min)	Rivotril			Ravotril			X		
	% disuelto	% recalculado	SD	% disuelto	% recalculado	SD	% disuelto	% recalculado	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	44,09	79,02	1,62	41,79	74,90	1,31	46,96	84,17	2,57
10	45,37	81,32	1,97	45,49	81,54	2,79	47,05	84,34	2,21
15	46,11	82,65	2,65	45,18	80,98	1,03	52,95	94,91	1,87
20	47,21	84,62	1,44	44,69	80,09	2,44	51,97	93,14	1,39
30	47,28	84,73	1,14	45,16	80,94	1,04	49,49	88,70	0,99
45	47,31	84,79	0,58	44,75	80,20	2,23	50,81	91,07	4,44
60	47,93	85,91	1,18	45,79	82,07	2,20	50,54	90,59	3,35
90	49,44	88,60	2,44	45,34	81,27	2,95	51,19	91,75	3,88
120	50,68	90,83	1,58	46,90	84,06	1,14	52,63	94,33	3,79

En la tabla 15 se representan el porcentaje de Rivotril, la formulación X y Ravotril en pH 6,8 con LSS al 0,1 % a diferentes tiempos, el porcentaje recalculado asumiendo como máximo 100% el valor máximo de estos y su desviación estándar.

Figura 5 Representación gráfica del perfil de disolución de Rivotril, la formulación X y Ravotril a pH 6,8 con LSS al 0,1 %



En la figura 5, se representa gráficamente los perfiles de disolución de Rivotril, la formulación X y Ravotril en pH 6,8 con LSS al 0.1% en diferentes tiempos.

Tabla 16 Calculo de f2 real y asumiendo máxima fracción 100% de Rivotril respecto a la formulación X y Ravotril en pH 6,8 con LSS al 0,1 %

Rivotril - X				Rivotril - Ravotril			
f2 real		f2 recalculado sobre 100%		f2 real		f2 recalculado sobre 100%	
EMA	FDA	EMA	FDA	EMA	FDA	EMA	FDA
71,87	71,87	>50	55,98	78,17	78,17	62,83	66,55

En la tabla 16 se representa los resultados del cálculo del factor de similitud f2 a partir de los datos de porcentaje disuelto y el porcentaje disuelto recalculado en pH 6,8 con LSS al 0,1 %. Los resultados calculados han seguido tanto los criterios de la EMA como de la FDA

En esta formulación el porcentaje de disolución es algo superior al porcentaje de los anteriores ya que el tensioactivo que contiene permite que se disuelvan mucho mejor las formulaciones llegando hasta un 50%. Como se observa Rivotril y la formulación X forman una asíntota en la que se superponen y Ravotril se mantiene un poco por debajo de ellos, por lo que en este caso este medio no consigue biopredicir el comportamiento de las formulaciones, ya que el como indican los datos de los estudios de bioequivalencia en humanos de la formulación X, la formulación X tiene una concentración máxima superior al resto de formulaciones que en este medio no se aprecian. Esto puede ser debido a que el LSS haya producido un gran aumento de la solubilidad del resto de formulaciones provocando una modificación de la concentración máxima de cada formulación.

A la hora de realizar el cálculo del factor de similitud este da un valor mayor de 50 por lo que las formulaciones que se realizan en este medio son similares y también es mayor de 50 en el factor de similitud recalculado. Estos resultados indican que este medio no resulta biopredictivo, ya que las formulaciones Rivotril – X no son biosimilares cuando este medio indica que si son biosimilares.

4.2.3 Perfil de disolución a pH 6,8 con Tween 20 al 0,2%

Debido a que los resultados de las formulaciones anteriores con LSS han aumentado los porcentajes de disolución se procede a hacer el ensayo con otro tipo de tensioactivo. En este caso con Tween 20 al 0,2 % para comprobar si puede aumentar los porcentajes de disolución.

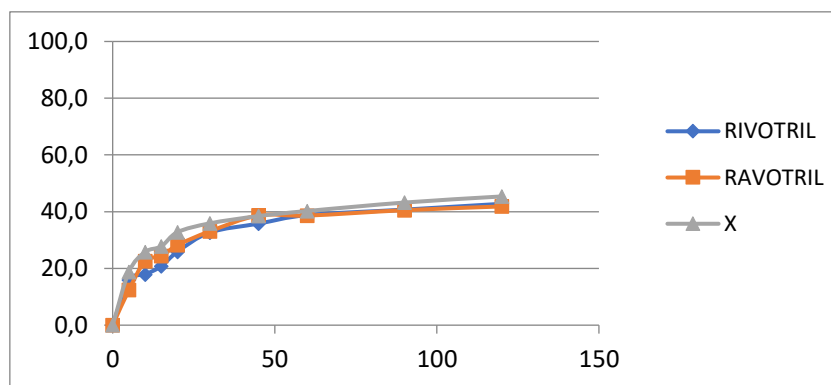
La tabla 16 y figura 6 muestra las formulaciones de Rivotril®, Ravotril® y la formulación X y sus porcentajes de disolución a diferentes tiempos en un medio a pH 6,8 en Tween 20 al 0,2 %. En la tabla 17 se indican los resultados de los cálculos del factor de similitud f2 de Rivotril® frente a las formulaciones genéricas

Tabla 16 Porcentaje de Rivotril disuelto a diferentes tiempos en referencia a la formulación X y Ravotril en pH 6,8 y Tween 20

Tiempo (min)	Rivotril			Ravotril			X		
	% disuelto	% recalculado	SD	% disuelto	% recalculado	SD	% disuelto	% recalculado	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	16,0	33,77	1,62	12,4	26,19	1,31	18,8	39,65	2,57
10	17,9	37,81	1,97	22,6	47,72	2,79	25,8	54,49	2,21
15	20,8	43,92	2,65	24,4	51,49	1,03	27,8	58,69	1,87
20	25,9	54,71	1,44	28,2	59,61	2,44	32,8	69,25	1,39
30	32,7	69,04	1,14	33,1	69,89	1,04	35,9	75,84	0,99
45	35,8	75,61	0,58	38,7	81,71	2,23	38,5	81,25	4,44
60	38,8	81,95	1,18	38,6	81,59	2,20	40,2	85,02	3,35
90	40,7	86,05	2,44	40,5	85,63	2,95	43,2	91,32	3,88
120	42,8	90,39	1,58	41,8	88,42	1,14	45,4	95,86	3,79

En la tabla 16 se representan el porcentaje de Rivotril, la formulación X y Ravotril en pH 6,8 con Tween 20 al 0,2% a diferentes tiempos, el porcentaje recalculado asumiendo como máximo 100% el valor máximo de estos y su desviación estándar.

Figura 6 Representación gráfica del perfil de disolución de Rivotril, la formulación X y Ravotril en pH 6,8 con Tween 20 al 0,2%



En la figura 6, se representa gráficamente los perfiles de disolución de Rivotril, la formulación X y Ravotril en pH 6,8 con Tween 20 al 0,2% en diferentes tiempos.

Tabla 17 Calculo de f2 real y asumiendo máxima fracción 100% de Rivotril respecto a la formulación X y Ravotril en pH 6,5 y Tween 20

Rivotril - X				Rivotril - Ravotril			
f2 real		f2 recalculado sobre 100%		f2 real		f2 recalculado sobre 100%	
EMA	FDA	EMA	FDA	EMA	FDA	EMA	FDA
66,64	66,64	46,96	48,40	78,48	78,48	61,12	61,12

En la tabla 17 se representa los resultados del cálculo del factor de similitud f2 a partir de los datos de porcentaje disuelto y el porcentaje disuelto recalculado en pH 6,8 con Tween 20 al 0,2%. Los resultados calculados han seguido tanto los criterios de la EMA como de la FDA

En la gráfica se observa como las formulaciones de Rivotril y Ravotril aumentan hasta llegar a una asíntota en torno a 40% y ahí se superponen, mientras que la formulación de X aumenta un poco más en la gráfica hasta un 45% y queda por encima de las otras 2, estos datos están de acuerdo con los datos de ensayo de bioequivalencia en humanos de la formulación X, ya que la formulación X tiene una concentración máxima mayor al resto de formulaciones. Hay que destacar que estas formulaciones con un medio Tween 20 al 0,2 % se disuelven lo mismo que los medios que propone la farmacopea y los cuales no contienen ningún tipo de tensioactivo, esto no tendría que ser así ya que al añadir un tensioactivo las formulaciones tendría que aumentar su perfil de disolución mucho más, pero por alguna razón que se desconoce no aumentan.

En cuanto al cálculo del factor de similitud se destaca que este es mayor de 50 en la formulación de Rivotril - Ravotril como en la recalculada. Mientras que el cálculo del factor de similitud a partir de los porcentajes disueltos estándar de Rivotril y X si es mayor de 50. Estos resultados son debido a que el medio de tween 20 al 0,2% produce un aumento de la disolución en las formulaciones de Rivotril y Ravotril provocando que su concentración máxima de ambas formulaciones se acerque a la concentración máxima de la formulación X, que tendría que ser claramente superior como indican los datos del estudio de bioequivalencia en humanos.

Este aumento provocado por el tensioactivo es significativo para f_2 ya que el resultado de f_2 indica que las formulaciones son biosimilares cuando realmente estas formulaciones no son biosimilares y por tanto este medio no es biopredictivo. Sin embargo, en el cálculo del factor de similitud recalculado comparando la formulación de Rivotril y X el valor de f_2 es menor de 50 lo cual indica que no son similares, esto concuerda con los datos de los estudios de bioequivalencia en humanos de la formulación X ya que la concentración máxima de la formulación X es superior al resto de formulaciones, por lo que las formulaciones Rivotril – X no son biosimilares.

Este medio consigue predecir el comportamiento observado *in vivo* aunque sería deseable que las diferencias fueran más evidentes. En ese sentido convendría realizar pequeñas modificaciones en el medio de disolución para intentar separar más los perfiles

Conclusiones

- Se han realizado los perfiles de disolución estándar siguiendo las indicaciones de la farmacopea para los fármacos Rivotril, Ravotril y la formulación X a diferentes pH fisiológicos.
- Una vez determinado los perfiles de disolución se compararon dichos perfiles usando el factor de similitud f_2 y se determinó que estos perfiles no eran capaces de predecir el comportamiento *in vivo* de forma fiable por lo que estos medios no han resultado ser biopredictivos del comportamiento *in vivo* aunque se acercan bastante.
- Se seleccionaron nuevos medios de disolución de disolución. Los nuevos medios fueron: medio pH 6,8 con LSS al 0,1% y medio pH 6,8 con Tween 20 al 0,2% los cuales mejoraron ligeramente el porcentaje de disolución de las formulaciones. De entre ellos el medio con Tween 20 consigue predecir el comportamiento *in vivo* aunque los resultados son muy ajustados.
- Los resultados alcanzados indican que es necesario continuar buscando más medios que sean más discriminativos y biopredictivos capaces de establecer correlaciones *in vivo* – *in vitro*.

Bibliografía

1. Pascual Segura. Patentes y medicamentos genéricos en España. En *Revista española de farmacoeconomía*; 1998. Pag 13 – 19.
2. Gil A, Lorenzana-Jiménez M. Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos. En *Revista Facultad Medicina UNAM Vol 52, No 6. Noviembre – diciembre 2009*
3. G García A, Gandía L. *El ensayo clínico en España*, Farmaindustria. 2001. Pag 121- 228.
4. Medicamentos Genéricos EFG. MSSSI. Ministerio de sanidad servicios sociales e igualdad. [Acceso abril 2018]. Disponible en: <http://www.msssi.gob.es/campañas/campanas10/medicamentosGenericosEFG/>
5. Ley 29/2006 de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. BOE. Boletín oficial del estado. Nº 178. 2006. Pag 9 – 20.
6. Garciela A, Hernández C, Avendaño C. Regulación de los medicamentos genéricos: evidencia y mito. En *Información terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, Vol 34, nº3/2010. [Acceso abril 2018]. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/en/publicaciones/articulo/docs/GarciaArietaRevTera pVol34N32010.pdf>
7. Consejo general de colegios oficiales de farmacéuticos. Medicamentos no sustituibles por razones de seguridad. En *Panorama actual del medicamento*. Vol 33, Nº 323. Mayo 2009. [Acceso abril 2018]. Disponible en: <https://botplusweb.portalfarma.com/Documentos/2009/6/26/39338.pdf>
8. Alvariza S, Bentancur C, Eiraldi R. *Guía de Farmacocinética*. Pag 9 – 40. ISBN 978-99-7400-659-1. 2010
9. Absorción y eliminación de fármacos. *Manual Merck*. Cap 298. [Acceso Abril 2018]. Disponible en: <http://manualmerck.tripod.com/MMCap298.htm>
10. Arancibia A. Calidad biofarmacéutica. Estudios *in vitro* e *in vivo*. En *Acta farmacéutica Bonaerense*. Vol 10 Nº 2 Pag 122 – 133. 1991

11. Talevi A, Quiroga P, Esperanza M. *Procesos biofarmacéuticos: su relación con el diseño de formas farmacéuticas y el éxito de la farmacoterapia*. Primera Edición. Pag 26 – 39. 2016. ISBN 978-950-34-1312-8.
12. Amido GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and in vivo bioavailability. En *Pharmaceutical Research*. Vol 12, Nº 3, 1995. Pag 413 – 420.
13. Center for drug evaluation and research (CDER). *Guidance for Industry. Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms*. FDA. U.S Food & Drug Agency. [Acceso abril 2018]. Disponible en: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070237.pdf>
14. Gonzalez-Alvarez I, Fernandez-Teruel C, Ruiz-Garcia A, Bermejo M. Ensayos de Disolución y Correlaciones *in vitro-in vivo*. En *Farmacia SudAmericana*, Vol 10, Nov 2002. Pag 3 -21. 1.2.1 (+1 de adelante hasta el siguiente) SI anterior no añadir nada.
15. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). *Guideline on the investigation of bioequivalence*. EMA. European medicines agency. CPMP/EWP/QWP/1401/98, Rev. 1, corr. 2010 [Acceso abril 2018]. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf
16. Amidon KS, Langguth P, Lennernas, H, Yu L, Amidon GL. Bioequivalence of oral products and the biopharmaceutics classification system: science, regulation, and public policy. En *Clinical pharmacology and therapeutics*. Vol 90, issue 3 sept 2011, pag 467-470. 1.3.1 (+2)
17. Ruiz Picazo A, Martinez-Martinez MT, Colón-Useche S, Iriarte R, Sánchez-Dengra B, González-Álvarez M. *In vitro* dissolution as a tool for formulation Selection: Telmisartan two-steps IVIVC. En *Molecular pharmaceutics* (aceptado) mayo de 2018. 1.3.1
16. Guzmán J. *Medicamentos genéricos: una aproximación interdisciplinar*. Primera edición. 2007. EUNSA. Pag 17 – 84. ISBN:978-84-313-2470-4

19. Saavedra I, Itrurriaga V, Luz M, Quiñones L. Biowaiver studies (in vitro) to establish equivalence of drugs. En *Cuadernos Medico Sociales*. Vol 51, N°2. 2011. Pag 66 – 79
20. Center for drug evaluation and research (CDER). Bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system guidance for industry. FDA. U.S Food & Drug Agency. [Acceso abril 2018]. Disponible en: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm070246.pdf>
21. Dressman, JB, Vertzoni M, Goumas K, Reppas C, Estimating drug solubility in the gastrointestinal tract. En *advance drug delivery review*. Vol 59, Issue 7. Julio 2007. Pag 591-602. 1.6.2
22. Marques M. Dissolution media simulating fasted and fed states. En *Dissolution Technologies*. Vol 11, Issue 2, nº 16 mayo 2004.
23. Fuchs A, Leigh M, Kloefer B, Dressman JB. Advances in the design of fasted state simulating intestinal fluids: FaSSIF-V3. En *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. Vol 94 agosto 2015. Pag 229 – 240
24. Söderlind E, Karlsson E, Carlsson A, Kong R, Lenz A, Lindborg S, Sheng JJ. Simulating fasted human intestinal fluids: understanding the roles of lecithin and bile acids. En *Molecular pharmaceutics*. Vol 7 Issue 5 octubre 2010. Pag 1498 – 1507.
25. Vogt M, Kunath K, Dressman JB. Dissolution improvement of four poorly water soluble drugs by cogrinding with commonly used excipients. En *European of journal pharmaceutics and biopharmaceutics*. Vol 68, Issue 2 febrero de 2008. Pag 330 – 337 1.6.3
26. Milton J, Joy T. *Surfactants and interfacial phenomena*. 4ª edición. Pag 2 – 66. 2012. ISBN: 978-0-470-54194-4
27. Centro de información del medicamento. CIMA. Ficha técnica Rivotril 2 mg comprimidos. [Acceso abril 2018]. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/52401/FT_52401.html

28. Clonazepam. Open chemistry database, DrugBank Database 5.0, Número de acceso DB01068. [Acceso abril 2018]. Disponible en: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01068>

29. European Pharmacopoeia Commission. *European Pharmacopoeia*. 7^o Edición. Pag 1729 – 1730. 2010. ISBN 978-9-287-10010-8

30. Clonazepam, Open chemistry data base, Pubchem. Compuesto 2802. [Acceso abril 2018]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2802>

