



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

ESTUDIOS DE DISOLUCIÓN DE FORMULACIONES DE CANDESARTAN CILEXETILO COMO HERRAMIENTA PREDICTIVA DE ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2017

Autor: Anca Ulici
Modalidad: Experimental
Tutor/es: Marta González Álvarez
María Isabel González Álvarez

ÍNDICE

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS).....	7
Bioexención basada en BCS.....	9
Correlación <i>in vitro-in vivo</i> (IVIVC)	10
Ensayo de disolución	11
Candesartan cilexetilo.....	17
OBJETIVO	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Compuestos ensayados.....	21
Perfiles de disolución	22
Valoración de muestras	26
RESULTADOS	28
Perfiles de disolución a pH 1,2.....	28
Perfiles de disolución a pH 4,5.....	29
Perfiles de disolución a pH 6,5.....	30
Perfiles de disolución a pH 6,8.....	31
Perfiles de disolución a pH 6,8 + Tween 20 al 0,2%.....	32
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	36
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

RESUMEN

Los ensayos de disolución *in vitro* se han convertido en los últimos años en una herramienta muy útil para determinar el rendimiento *in vivo* de un fármaco. La importancia de estas pruebas se basa en el hecho de que la velocidad y la tasa de absorción de un fármaco administrado por vía oral, depende de la disolución de la forma farmacéutica en el tracto gastrointestinal. Estos ensayos tienen especial interés para los fármacos de baja solubilidad (clase II del BCS), debido al hecho de que esta clase de fármacos es más susceptible de presentar una correlación significativa entre la disolución *in vitro* y el rendimiento *in vivo*. En el caso de los genéricos pertenecientes a esta clase de fármacos, desarrollar metodologías *in vitro* que permitan predecir el comportamiento *in vivo*, permite reducir el número de estudios en humanos tanto para el proceso de la aprobación de comercialización, como para cambios post-aprobación.

El presente estudio se diseñó con el objetivo de encontrar una metodología *in vitro* que permita predecir el comportamiento *in vivo* de dos medicamentos genéricos frente a un medicamento de referencia, que contienen como principio activo Candesartan cilexetilo, un fármaco clase II. En concreto, se trata de determinar las características de un ensayo de disolución que permita correlacionar los perfiles de disolución *in vitro* con los parámetros obtenidos en los ensayos de bioequivalencia realizados en voluntarios sanos.

Los ensayos de disolución se realizaron en el aparato de paleta (aparato 2), siguiendo las indicaciones que marcan las guías regulatorias. Se midieron las concentraciones de fármaco disuelto a distintos tiempos, en distintos medios de disolución. Por último, se analizaron los datos obtenidos comparándolos con los resultados observados en ensayos de bioequivalencia en humanos.

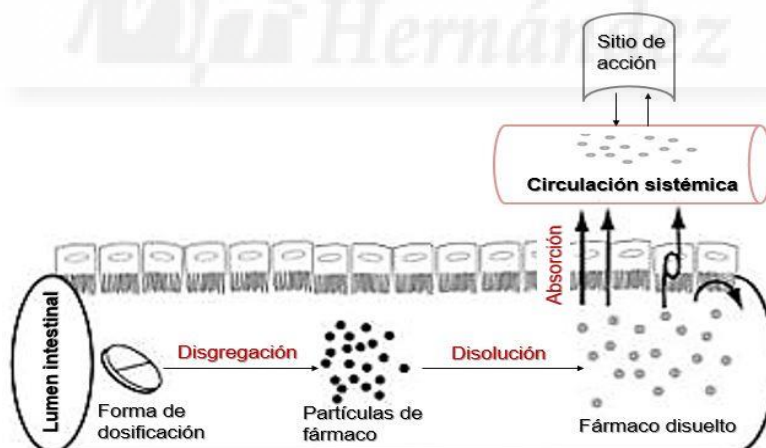
Los resultados indican que los medios de disolución estándar propuestos por la farmacopea no son biopredictivos para este fármaco en concreto. La adición de un tensioactivo al medio favorece la disolución del principio activo, pero no consigue predecir su comportamiento *in vivo*. Esto hace necesario seguir con la búsqueda de medios biopredictivos.

INTRODUCCIÓN

La eficacia terapéutica de una forma de dosificación de un medicamento se determina por la concentración de fármaco en el sitio de acción. Esta concentración es difícil de medir de forma directa por lo que se asume que se encuentra en equilibrio con la concentración presente en la circulación general¹. La concentración plasmática va a depender a su vez de la forma farmacéutica y vía de administración del medicamento.

La vía oral es la más antigua de las vías utilizadas y sigue siendo la vía preferida de administración de fármacos; es segura, económica y presenta el grado más alto de cumplimiento por parte de los pacientes. Después de la administración oral, la difusión del principio activo (PA) desde el tracto gastrointestinal (GI) hacia la circulación sistémica requiere la desintegración de la forma farmacéutica, seguida de la disolución del fármaco en el lumen intestinal.

Figura 1. Representación gráfica de los procesos de liberación, absorción y distribución de un fármaco, tras la administración oral de una forma farmacéutica sólida de liberación inmediata. Modificada de [2].



Las propiedades de disolución del PA condicionan su absorción, por lo que pueden tener un impacto directo sobre su biodisponibilidad y su posterior efecto terapéutico. Por tanto, las pruebas de disolución *in vitro* podrían ser una herramienta de gran utilidad para predecir el comportamiento *in vivo* del medicamento, siempre y cuando estas pruebas simulen las mismas condiciones que las presentes en el tracto GI.

Desde hace más de medio siglo, las pruebas de disolución *in vitro* se realizan principalmente para abordar cuestiones de control de calidad: evaluar la calidad final de un producto lote a lote, guiar el desarrollo de nuevas formulaciones y asegurar la calidad y el rendimiento del producto después de cambios en la formulación, en el proceso de fabricación, en el sitio de fabricación y en el aumento en escala del proceso de fabricación^{3,4}. Actualmente se utiliza además como herramienta en el desarrollo de genéricos, llegando incluso, en algunos casos, a admitirse como prueba de bioequivalencia.

Un medicamento genérico es un medicamento que tiene la misma composición cualitativa y cuantitativa en principios activos y la misma forma farmacéutica que el medicamento de referencia y cuya bioequivalencia con el medicamento de referencia haya sido demostrada por estudios adecuados de biodisponibilidad⁵.

El medicamento de referencia es aquel que salió primero al mercado y cuya autorización de comercialización se concede tras la presentación de estudios clínicos que han demostrado su calidad, eficacia y seguridad. La patente del medicamento innovador le permite una exclusividad en el mercado de 20 años. Una vez expirada la patente, los laboratorios farmacéuticos tienen la libertad de explotar el producto y pueden empezar a producir medicamentos con el mismo principio activo, a los que se les conoce como medicamentos genéricos.

Desde su incorporación al mercado farmacéutico español en 1997, los medicamentos genéricos han tenido un impacto positivo tanto desde una perspectiva sanitaria como económica. Según la Asociación Española de Medicamentos Genéricos (AESEG)⁶, estas especialidades farmacéuticas aportan al Sistema Nacional de Salud (SNS) un ahorro anual de más de 1.000 millones de euros, lo que permite invertir estos recursos en otras áreas de salud. Además, la industria de medicamentos genéricos impulsa la economía nacional: de cada diez genéricos que se consumen en nuestro país, siete se fabrican en España. En 2016, el mercado de genéricos en España representó el 20% del total del mercado farmacéutico en valor económico y un porcentaje superior al 40% de las unidades reembolsadas.

El genérico tiene el precio de comercialización más económico que la marca de referencia, lo que facilita el acceso a medicamentos terapéuticamente equivalentes al medicamento de referencia, pero a precios más bajos. Su presencia en el mercado también estimula que los productos originales bajen sus precios para ser más competitivos. Los estudios en este sector indican que, en los últimos años, los medicamentos de marca han reducido su precio entre un 15% y un 40% gracias a la competencia de los genéricos⁶.

Para garantizar la intercambiabilidad, los medicamentos genéricos deben ajustarse a los mismos estándares de calidad, eficacia y seguridad que los medicamentos de referencia y, además, ser bioequivalentes con estos, lo que implica la equivalencia química, galénica, farmacocinética y clínica.

Según la OMS¹, dos medicamentos son bioequivalentes si:

- son equivalentes farmacéuticos (contienen la misma cantidad del mismo principio activo, en la misma forma de dosificación y que cumple los mismos estándares) o alternativas farmacéuticas (contienen el mismo principio activo, pero difieren en la forma de dosificación, concentración o forma química);
- su biodisponibilidad, en términos de velocidad (C_{max} y t_{max}) y grado de absorción (Área Bajo la Curva (AUC)), después de la administración de la misma dosis molar bajo las mismas condiciones, es similar de tal forma que se puede esperar que sus efectos, con respecto a eficacia y seguridad, sean los mismos.

La bioequivalencia se puede determinar mediante estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos *in vivo* y, en algunos casos, mediante estudios de equivalencia *in vitro*⁷, que consisten en el estudio comparativo de los perfiles de disolución *in vitro* entre el medicamento genérico y el de referencia.

Uno de los retos de la investigación farmacéutica es encontrar una relación entre la liberación de fármacos *in vitro* desde una forma farmacéutica y los perfiles *in vivo* de dichos fármacos, lo que se denomina "Correlación *In Vitro-In Vivo*" (IVIVC). El objetivo principal de esta correlación consiste en reducir el

número de los estudios de bioequivalencia en humanos tanto para el proceso de desarrollo de un medicamento como para cambios post-aprobación. Además, puede utilizarse en el desarrollo de medicamentos genéricos como sustituto de los ensayos de biodisponibilidad *in vivo*. La solicitud de bioequivalencia por esta vía se le denomina bioexención y está basada en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS).

SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA (BCS)

El BCS (Biopharmaceutics Classification System) fue propuesto en el año 1995, por Gordon Amidon⁸ y se basa en clasificar los principios activos según su solubilidad acuosa y permeabilidad intestinal, en cuatro clases:



Alta solubilidad

Según la Agencia Europea de Medicamentos (EMA)⁷, un fármaco es considerado altamente soluble cuando la dosis única más alta administrada como formulación de liberación inmediata se disuelve completamente en 250 ml de tampones en el intervalo de pH de 1 a 6,8 a 37 ± 1 °C. La Organización Mundial de la Salud (OMS)¹ y la Food and Drug Administration (FDA)⁴ tienen definiciones de solubilidad parecidas a las de la EMA. La única diferencia está en los valores de pH: la OMS establece valores de pH en un rango de 1,2 a 6,8 mientras que la FDA establece un pH comprendido entre 1 y 7,5.

Alta permeabilidad

La EMA⁷ define como fármaco altamente permeable aquel que tiene un grado de absorción $\geq 85\%$. Este parámetro debe justificarse mediante ensayos en humanos a través de estudios de biodisponibilidad o balance de masas. La OMS¹ propone los mismos criterios que la EMA, mientras que la FDA⁴ indica que la alta permeabilidad se alcanza cuando la absorción intestinal es $\geq 90\%$.

En base a esta clasificación, se puede predecir cuál será el paso limitante en la absorción del PA.

- Clase I (alta solubilidad, alta permeabilidad): el vaciado gástrico es el paso limitante.
- Clase II (baja solubilidad, alta permeabilidad): la solubilidad y la velocidad de disolución son los pasos limitantes.
- Clase III (alta solubilidad, baja permeabilidad): la permeabilidad de la membrana intestinal es el paso limitante.
- Clase IV (baja solubilidad, baja permeabilidad): ambos son procesos limitantes de la absorción del fármaco en el tracto GI.

Aunque el BCS basa su clasificación en la solubilidad y permeabilidad del PA, la velocidad de disolución también influye en la absorción del fármaco y podría ser un factor limitante en este proceso. Se considera que una forma farmacéutica tiene una velocidad de disolución muy rápida o rápida cuando 85% o más de la cantidad de PA se disuelve en 15 o 30 minutos, respectivamente, a 37 ± 1 °C usando el aparato de paleta a 75-100 rpm en un volumen igual o menor a 900 ml, en cada uno de los siguientes medios: solución de HCl a pH 1.2, tampón acetato a pH 4.5 y tampón fosfato a pH 6.8¹.

En base a la solubilidad y permeabilidad del PA, contenido y naturaleza de los excipientes y las características de disolución de la forma de dosificación, para algunos medicamentos, el BCS ofrece la oportunidad de eximir los estudios de bioequivalencia *in vivo* si estos pueden justificarse mediante datos *in vitro* satisfactorios⁷.

BIOEXENCIÓN BASADA EN BCS

La bioexención se define como un proceso regulatorio que permite la aprobación de un medicamento en base a estudios de equivalencia *in vitro* como sustituto de las pruebas de equivalencia *in vivo*. De esta forma se evita el daño potencial que se les puede producir a los voluntarios que participan en estos estudios, que además son muy complejos y altamente costosos.

El concepto es aplicable a formulaciones sólidas orales de liberación inmediata y acción sistémica que tienen la misma forma farmacéutica. La solicitud de una bioexención está restringida a fármacos altamente solubles, con absorción *in vivo* conocida y que no tengan un índice terapéutico estrecho.

Hoy en día, las agencias reguladoras de medicamentos aceptan las bioexenciones como sustitutos de los ensayos de bioequivalencia *in vivo* y especifican los requisitos necesarios para llevar a cabo estos estudios. A nivel europeo, EMA⁷ admite bioexenciones para formas farmacéuticas de liberación inmediata de las clases I y III del BCS que cumplan los siguientes requisitos:

- Clase I
 - Velocidad de disolución muy rápida (>85% en 15 minutos) o rápida (85% en 30 minutos) para la formulación test y referencia, que se ha demostrado mediante ensayos de disolución *in vitro*.
 - Los excipientes que pueden afectar la biodisponibilidad deben ser cualitativa y cuantitativamente los mismos. En general, se prefiere el uso de los mismos excipientes en cantidades similares.
- Clase III
 - Velocidad de disolución muy rápida (>85% en 15 minutos) para la formulación test y referencia, que se ha demostrado mediante ensayos de disolución *in vitro*.
 - Los excipientes que pueden afectar la biodisponibilidad deben ser cualitativa y cuantitativamente los mismos; otros excipientes deben ser cualitativamente los mismos y cuantitativamente muy similares.

Estudios recientes^{9,10} señalan que el concepto de bioexención basada en correlaciones *in vitro-in vivo* (IVIVC) podría extenderse a algunos fármacos de clase II del BCS, bajo la suposición de que el fármaco se disuelve completamente durante el paso gastrointestinal. La justificación científica para la concesión de esta bioexención radica en que su absorción oral probablemente esté limitada por la disolución *in vivo*. La disolución *in vivo* se puede estimar mediante estudios *in vitro*, por lo que es posible establecer una correlación IVIV para esta clase de fármacos.

CORRELACIÓN IN VITRO-IN VIVO (IVIVC)

La determinación de las condiciones de disolución *in vitro* apropiadas, que simulen las condiciones *in vivo*, pueden conducir a la obtención de buenas predicciones del comportamiento *in vivo* y permiten establecer una IVIVC para formulaciones orales¹¹.

Una IVIVC es un modelo matemático predictivo que describe la relación entre una propiedad *in vitro* de una forma de dosificación y una respuesta *in vivo* relevante. Generalmente, la propiedad *in vitro* es la velocidad y el grado de disolución del fármaco o su liberación, mientras que la respuesta *in vivo* es la concentración plasmática del fármaco o la cantidad del fármaco absorbido^{12,13}.

Para poder desarrollar y aplicar una IVIVC, la disolución o liberación del fármaco desde su forma farmacéutica tiene que ser el paso limitante en el proceso de absorción del fármaco en la circulación sistémica y el principio activo tiene que presentar alta permeabilidad⁴.

En el caso de fármacos de baja solubilidad/alta permeabilidad (clase II), la disolución del fármaco es el paso limitante de la velocidad de absorción y se puede esperar una IVIVC. Para ello, se recomienda realizar perfiles de disolución en distintos medios hasta encontrar el que sea capaz de reproducir el comportamiento *in vivo*.

ENSAYO DE DISOLUCIÓN

El ensayo de disolución para formas sólidas orales se utiliza para determinar la velocidad de disolución de los PA contenidos en estas formas farmacéuticas. Las especificaciones para llevar a cabo este ensayo vienen recogidas en las diferentes farmacopeas.

A continuación, se detallan los requisitos que exige la Real Farmacopea Española¹⁴ para la realización del ensayo respecto a aparatos y medios de disolución.

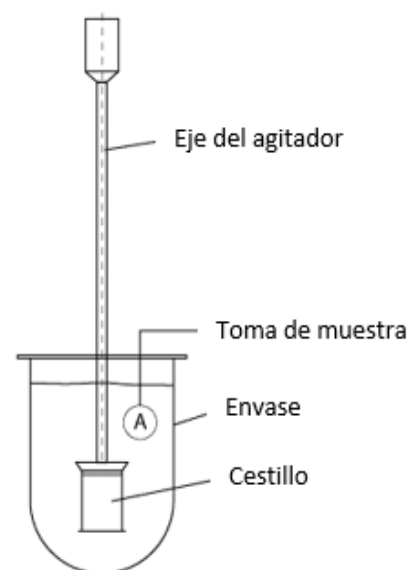
Aparatos

La elección del equipo se determina en función de las características físico-químicas de la forma farmacéutica que se va a ensayar. Los aparatos utilizados más comúnmente en los ensayos de disolución son el Aparato de cestillo (aparato 1) y el Aparato de paleta (aparato 2). Otros aparatos que se pueden utilizar son el Aparato con cilindro oscilante (aparato 3) y el Aparato de flujo continuo (aparato 4).

En el presente estudio se utilizó el Aparato de paleta (aparato 2), cuyas características se detallan en el apartado “Materiales y métodos” de este trabajo. Los demás aparatos se describen a continuación.

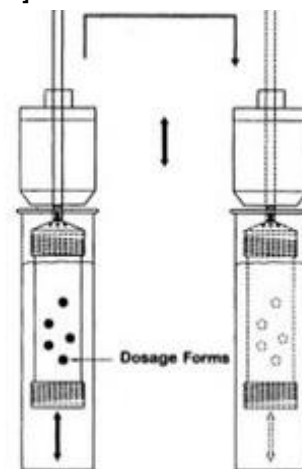
El **Aparato de cestillo (aparato 1)** consta de un envase cilíndrico de fondo semiesférico con un volumen de 1000 ml, de un material transparente apropiado. El envase dispone de una tapa, para evitar la evaporación del medio de disolución, que tiene un orificio central por el que pasa el eje del agitador y otro orificio que permite la introducción de los dispositivos de toma de muestras. El agitador está constituido por un eje vertical en cuya parte inferior se fija un cestillo cilíndrico que se destina a recibir la forma farmacéutica a ensayar. El envase está sumergido en un baño termostático que permite mantener la temperatura del medio de disolución a $37 \pm 0,5$ °C.

Figura 2. Aparato de cestillo (aparato 1).
Modificada de [15].



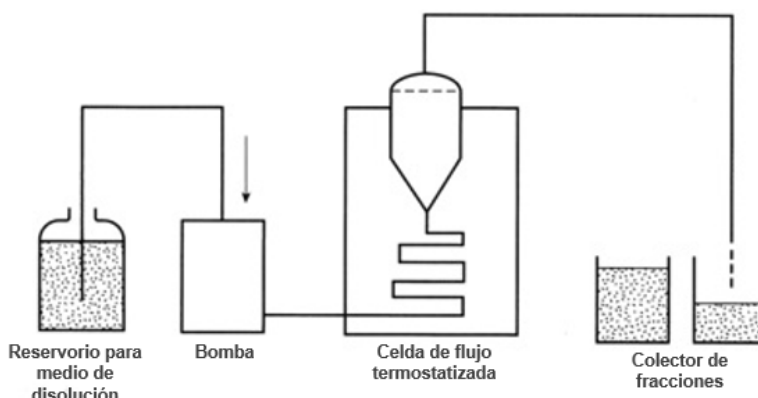
El **Aparato con cilindro oscilante (aparato 3)** se compone de un conjunto de vasos cilíndricos de fondo plano con una tapa en la parte superior que evita la evaporación, un grupo de cilindros oscilantes de vidrio con accesorios y mallas de un material inerte, que se fijan a la parte superior e inferior de los cilindros oscilantes; un motor y una transmisión que hacen oscilar los cilindros en sentido vertical dentro de los vasos. Los vasos están sumergidos parcialmente en un baño de agua que permite mantener la temperatura a $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ durante el ensayo.

Figura 3. Aparato con cilindro oscilante (aparato 3). Modificada de [16].



El **Aparato de flujo continuo o Celda de flujo continuo (aparato 4)** está constituido por un reservorio y una bomba para el medio de disolución, una celda de flujo en la que se coloca la forma farmacéutica a ensayar y un baño de agua que mantiene el medio de disolución a $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$. La bomba desplaza el medio de disolución con un flujo constante a través de la celda de flujo en dirección ascendente. La celda, constituida de un material transparente e inerte, está montada verticalmente y dotada de un filtro para retener las partículas no disueltas.

Figura 4. Aparato de flujo continuo (aparato 4). Modificada de [17].

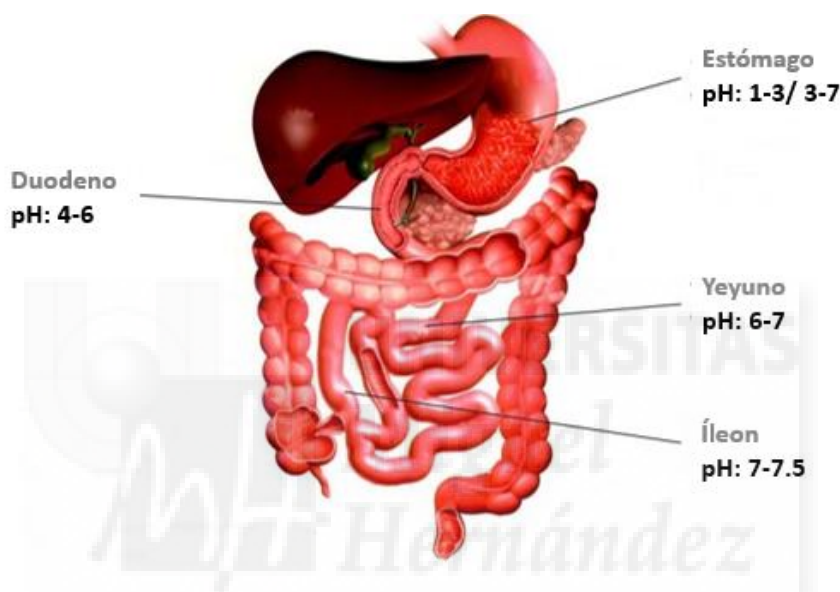


Medios de disolución

Los medios de disolución empleados deberán basarse en las características fisicoquímicas del fármaco y las condiciones ambientales a las cuales podría estar expuesta la forma de dosificación tras la administración oral.

Para determinar los perfiles de disolución de las formas farmacéuticas orales, se utilizan normalmente medios acuosos tamponados en un rango de pH que simula el del tracto gastrointestinal (figura 5). Esto permite la interpretación de los datos de disolución en relación al rendimiento *in vivo* del fármaco. Las agencias reguladoras especifican que el ensayo se debe realizar mínimamente con tres pHs: 1,2 (solución de HCl), 4,5 (tampón acetato) y 6,8 (tampón fosfato).

Figura 5. Valores de pH de los distintos tramos del tracto GI. Modificada de [18].



Para los medios de disolución tamponados se recomienda ajustar el pH con una aproximación de $\pm 0,05$ unidades del valor prescrito. Si hay gases disueltos en el medio, se pueden formar burbujas susceptibles de falsear los resultados, por lo que deben eliminarse antes del ensayo mediante un procedimiento de filtración a vacío. Por lo general, el volumen del medio de disolución es de 500, 900 o 1000 ml.

Sin embargo, además del pH, en las condiciones *in vivo* hay otros factores que pueden influir en la disolución de los fármacos, como la osmolaridad, la fuerza iónica, la tensión superficial, la viscosidad y la presencia de alimentos en los fluidos intestinales. Por ello, en los últimos años se han estudiado y desarrollado nuevos medios de disolución capaces de predecir de forma más fisiológica el comportamiento *in vivo* de los diferentes fármacos. Se trata de los medios biorrelevantes o biopredictivos^{3,11}.

Los medios más importantes y comúnmente utilizados son:

- Fluido gástrico simulado en estado de ayunas (FaSSGF: *Fasted State Gastric Fluid*)

El FaSSGF contiene pepsina y cantidades bajas de sales biliares y lecitina. Es un medio altamente recomendable para experimentos *in vitro* ya que los datos de solubilidad en FaSSGF proporcionan una base importante para la evaluación de la solubilidad intragástrica en estado de ayuno durante un estudio de bioequivalencia *in vivo*.

Tabla 1. Composición del medio que simula el contenido gástrico en estado de ayunas

FaSSGF	
Taurocolato sódico	80 µM
Lecitina	20 µM
Pepsina	0,1 mg/ml
NaCl	34,2 mM
HCl conc.	csp pH 1,6
Agua desionizada	csp 1 L
pH	1,6
Osmolalidad (mOsmol/kg)	120,7 ± 2,5
Capacidad tampón (mEq/Ph/L)	-
Tensión superficial (mN/m)	42,6

- Fluido intestinal simulado en estado de ayunas (FaSSIF: *Fasted State Small Intestinal Fluid*)

El FaSSIF simula las condiciones del intestino delgado en estado de ayunas. Además de pH, osmolalidad y capacidad tampón, el FaSSIF tiene en cuenta la capacidad de solubilización de los fluidos intestinales en ayunas. Este medio tiene un pH de 6,5 y contiene sales biliares (taurocolato sódico) y fosfolípidos (lecitina) en una proporción de 4:1. Estos componentes facilitan la humectación del sólido y la solubilización de compuestos lipófilos.

Tabla 2. Composición del medio que simula el contenido intestinal en estado de ayunas

FaSSIF	
Taurocolato sódico	3 mM
Lecitina	0,75 mM
NaH ₂ PO ₄	3,438 g
NaCl	6,186 g
NaOH	csp pH 6,5
Agua desionizada	csp 1 L
pH	6,5
Osmolalidad (mOsmol/kg)	~270
Capacidad tampón (mEq/Ph/L)	~12
Tensión superficial (mN/m)	54

- Fluido gástrico simulado en presencia de alimentos (FeSSGF: *Fed State Gastric Fluid*)

En presencia de alimentos, la composición del fluido gástrico dependerá en gran medida de la composición de la comida ingerida. El medio ideal que pueda predecir las condiciones gástricas en el estado postprandial, debe tener propiedades nutritivas y fisicoquímicas similares a las de una comida estándar, tener baja variabilidad entre lotes y ser fácil de preparar.

Dos alternativas que se acercan a estas especificaciones son la leche y Ensure® Plus. Los dos medios están estandarizados; el primero representa a la leche de vaca entera con un contenido de grasa de 3,5%, mientras que Ensure® Plus tiene una composición similar a un desayuno en cuanto a la proporción carbohidratos/grasas/proteínas.

Tabla 3. Composición del medio que simula el contenido gástrico en presencia de alimentos

FeSSGF	
NaCl	237,02 mM
Ácido acético	17,12 mM
Acetato sódico	29,75 mM
Leche UHT:tampón	1:1
HCl 0,1 N	csp pH 5,0
Osmolalidad (mOsmol/kg)	400 ± 10

- Fluido intestinal simulado en presencia de alimentos (FeSSIF: *Fed State Small Intestinal Fluid*)

Igual que en el estómago, las condiciones de disolución del intestino en estado postprandial van a depender mucho de la composición de los alimentos ingeridos. Después de la ingesta de alimentos, hay cambios tanto en la hidrodinámica como en el volumen intraluminal. El pH del contenido intestinal después de una comida sólida es menor que el pH en ayunas, mientras que la capacidad tampón y la osmolalidad aumentan significativamente. Con el objetivo de desarrollar un medio representativo de estas condiciones, se desarrolló FeSSIF que contiene un tampón acetato, taurocolato sódico y lecitina que, en concentraciones muy superiores al mismo medio en estado de ayunas, reflejan la respuesta biliar a la ingesta de comida.

Tabla 4. Composición del medio que simula el contenido intestinal en presencia de alimentos

FeSSIF	
Taurocolato sódico	15 mM
Lecitina	3,75 mM
CH₃COOH	8,65 g
NaCl	11,874 g
NaOH pellets	4,04 g
Agua desionizada	csp 1 L
pH	5
Osmolalidad (mOsmol/kg)	~670
Capacidad tampón (mEq/Ph/L)	~72
Tensión superficial (mN/m)	48

CANDESARTAN CILEXETILO

Candesartan es un fármaco clase II, cuya comercialización se aprobó el 4 de junio de 1998 por la FDA, bajo el nombre comercial "Atacand". Se han identificado seis patentes del medicamento pertenecientes al laboratorio AstraZeneca LP¹⁹. El 18 de abril de 2011 expiró la primera patente, lo que permitió la explotación del medicamento por otros laboratorios y llevó a la aprobación de genéricos de los laboratorios Sandoz (03/05/2013), Apotex (10/01/2014) y Macleods (05/12/2016)²⁰.

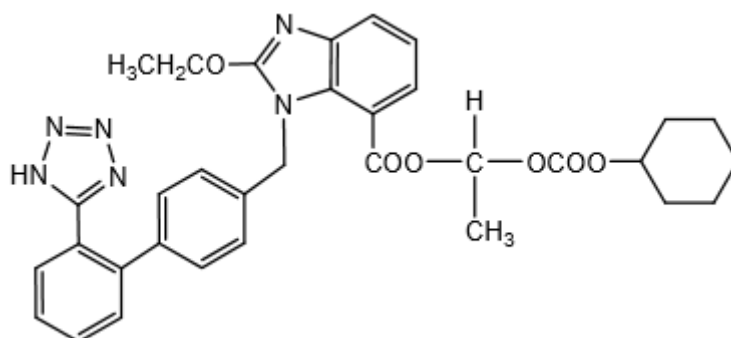
No obstante, dado que no se conoce la formulación exacta del medicamento de referencia, es complicado desarrollar genéricos bioequivalentes. En ocasiones, tras la propuesta de una formulación, el genérico falla en el estudio de bioequivalencia en humanos. Es por ello que sería interesante desarrollar metodologías *in vitro* fiables para predecir el comportamiento del Candesartan cilexetilo *in vivo*.

Propiedades farmacodinámicas

Grupo farmacéutico: antagonistas de angiotensina II.

Candesartán cilexetilo es un profármaco que se convierte rápidamente en el fármaco activo Candesartán, por hidrólisis del éster durante la absorción en el tracto gastrointestinal. Candesartán es un ARA-II, selectivo para los receptores de tipo AT1 de la angiotensina II, con una fuerte unión y una lenta disociación de los mismos. No posee actividad agonista.

Figura 6. Estructura del Candesartan cilexetilo



La angiotensina II es la hormona vasoactiva principal del sistema renina-angiotensina-aldosterona y juega un papel en la fisiopatología de la hipertensión y de otras alteraciones cardiovasculares. También tiene un papel en la patogénesis de la lesión e hipertrofia orgánica. Los efectos fisiológicos principales de la angiotensina II, tales como la vasoconstricción, estimulación de la aldosterona, regulación de la homeostasis de iones y agua, y la estimulación del crecimiento celular, son mediados por el receptor de tipo 1 (AT1)²¹.

El bloqueo del efecto de la angiotensina II sobre los receptores AT1 por el Candesartan se traduce en una reducción de los efectos presores de esta molécula. Además, este bloqueo se ha involucrado en toda una serie de efectos distintos al hipotensor en estudios en animales: prevención de la hipertrofia ventricular, disminución de la glomeruloesclerosis y proteinuria en ratas con insuficiencia renal inducida experimentalmente, protección de la lesión por reperfusión tras isquemia cardíaca, efecto cardioprotector en un modelo animal de miocarditis vírica inducida por el virus de la encefalomiocarditis, y un efecto protector del daño neurológico en modelos animales de isquemia cerebral²².

Candesartán no afecta a la ECA o a otros sistemas enzimáticos normalmente asociados con el uso de los inhibidores de la ECA. Puesto que no tiene efecto sobre la degradación de quininas, o sobre el metabolismo de otras sustancias, como la sustancia P, parece poco probable que los ARA-II puedan asociarse a incidencia de tos²¹.

Propiedades farmacocinéticas²¹

Después de su administración oral, Candesartán cilexetilo se convierte en el fármaco activo Candesartán. La biodisponibilidad absoluta de Candesartán es aproximadamente del 40% después de la administración oral de una solución de Candesartán cilexetilo. La biodisponibilidad relativa de una formulación de Candesartán cilexetilo en comprimidos en comparación con la misma solución oral es aproximadamente del 34% con muy poca variabilidad. La concentración

sérica máxima media (C_{max}) se alcanza 3-4 horas después de la ingesta del comprimido. Las concentraciones séricas de Candesartán aumentan de forma lineal al incrementar las dosis dentro del intervalo terapéutico de dosificación.

El área bajo la curva de las concentraciones séricas de Candesartán respecto al tiempo (AUC) no se ve afectada por la comida. Candesartán se une en gran medida a proteínas plasmáticas (más de un 99%). El volumen aparente de distribución de Candesartán es de 0,1 l/kg. Candesartán se elimina de forma inalterada principalmente en orina y bilis y sólo una pequeña proporción se elimina por metabolismo hepático (CYP2C9).

Es por tanto un candidato idóneo sobre el que desarrollar metodologías biopredictivas.



OBJETIVO

Objetivo general

El objetivo de este estudio consiste en encontrar una metodología *in vitro* que permita predecir el comportamiento *in vivo*, observado en ensayos de bioequivalencia en humanos, de dos formulaciones genéricas de Candesartan cilexetilo respecto al medicamento de referencia Atacand®.

En concreto, se trata de determinar las características de un ensayo de disolución que permita correlacionar los perfiles de disolución *in vitro* con los parámetros obtenidos en los ensayos de bioequivalencia realizados en voluntarios sanos.

Objetivos específicos

- Realizar los perfiles de disolución según las indicaciones de la farmacopea (con tampones estándar), del fármaco de referencia (Atacand®) y las dos formulaciones genéricas (A y B) y comprobar si los ensayos de velocidad de disolución *in vitro* son capaces de predecir el comportamiento *in vivo* mediante comparación estadística de los perfiles.
- En caso de que los medios estándar no sean capaces de predecir el comportamiento observado en los ensayos *in vivo*, seleccionar nuevos medios de disolución.
- Determinar los perfiles cinéticos de disolución de la formulación comercial Atacand® y las formulaciones genéricas con los nuevos medios propuestos y comparar los nuevos perfiles obtenidos utilizando el factor de similitud f_2 .

MATERIALES Y MÉTODOS

COMPUESTOS ENSAYADOS

El principio activo estudiado fue el Candesartan cilexetilo. Las dos formulaciones test a ensayar fueron proporcionadas por dos laboratorios farmacéuticos. El producto de referencia (Atacand®, AstraZeneca) fue comprado en una farmacia. Como patrón se usó Candesartan cilexetilo puro. Los comprimidos ensayados, del medicamento de referencia y de las dos formulaciones genéricas, contenían 32 mg de principio activo.

En la tabla 5 se muestran los lotes con los que se trabajó y los resultados de los respectivos ensayos en humanos: los ratios (test/referencia) de las concentraciones máximas alcanzadas en plasma (C_{max}), las áreas bajo la curva (AUC) y sus respectivos intervalos de confianza (IC) al 90%.

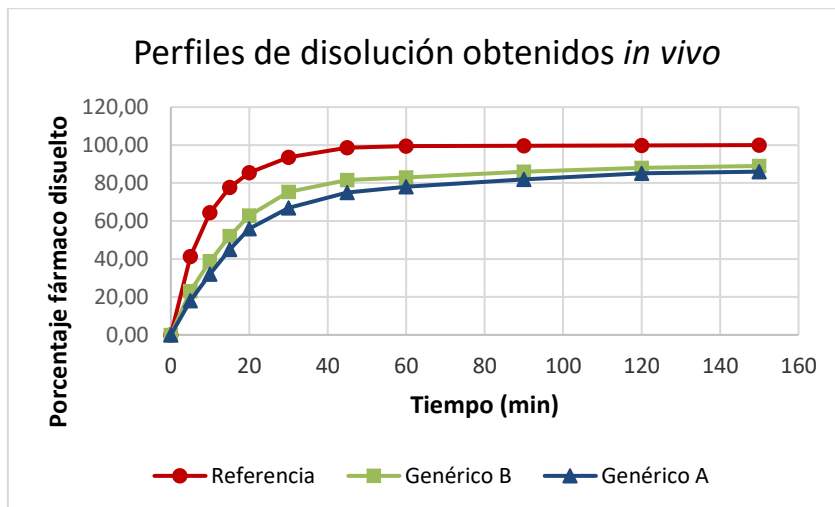
Para aceptar la bioequivalencia, los ratios de C_{max} y AUC deben ser mayores del 85% en ambos casos y los IC deben estar comprendidos entre el 80 y 125% para que los lotes se consideren bioequivalentes. Como se puede observar ambos lotes cumplen la condición de bioequivalencia, pero los valores de C_{max} están muy próximos al límite inferior y por ello pueden utilizarse para la obtención de herramientas *in vitro* discriminativas.

Tabla 5. Datos de los estudios de bioequivalencia *in vivo* de los genéricos A y B con respecto al medicamento de referencia Atacand®, que contienen como principio activo Candesartan cilexetilo.

Lote	Bioequivalente en estudios en humanos	C_{max}		AUC	
		Ratio (%)	IC (%)	Ratio (%)	IC (%)
A	SI Bioequivalente bajo	86,16	83,09-93,53	87,68	83,86-91,67
B	SI Bioequivalente bajo	89,1	84,32-94,14	92,69	89,06-96,46

Al representar gráficamente los resultados obtenidos *in vivo*, se obtendrían perfiles de disolución que se ordenarían de la misma forma que los que se muestran en la figura 7.

Figura 7. Perfiles de disolución esperados tras la representación gráfica de los resultados obtenidos en estudios de bioequivalencia *in vivo* de los genéricos A y B con respecto al medicamento de referencia Atacand®.



PERFILES DE DISOLUCION

Diseño del ensayo

Obtener los perfiles de disolución de las dos formulaciones test (A y B) y de la formulación de referencia (Atacand®), en diferentes medios de disolución. Tras la obtención de los perfiles de disolución de las tres formulaciones, comparar los perfiles estudiados y determinar la similitud mediante métodos estadísticos (factor de similitud f_2). Además, determinar el medio de disolución ideal que permita predecir los resultados obtenidos *in vivo*.

Aparato de disolución

Para el presente trabajo se utilizó el aparato de paleta (aparato 2) marca Pharma-Test PT-DT70.

Figura 8. Aparato de paleta (aparato 2) marca Pharma-Test PT-DT70 [23].



El aparato está constituido por:

- un envase cilíndrico de fondo semiesférico, con una capacidad de 1000 ml, de un material transparente apropiado. El envase está dotado de una tapa, para evitar la evaporación, que tiene un orificio central por el que pasa el eje del agitador y otro orificio que permite la introducción de los dispositivos de toma de muestras;
- un agitador constituido por un eje vertical en cuya parte inferior se fija una paleta. El eje se coloca de forma que no se desvíe más de 2 mm del eje del envase y que la parte inferior de la paleta se sitúe a una distancia de 25 ± 2 mm del fondo interior del envase. La rotación del agitador debe ser uniforme sin oscilaciones importantes. La agitación común es de 50-100 rpm.
- un baño de agua termostataado que permita mantener la temperatura del medio de disolución a $37 \pm 0,5$ °C durante el ensayo.

Figura 9. Envase del aparato 2 de disolución [24].



Medios de disolución

Los pHs y la composición de los medios de disolución ensayados en el presente trabajo se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Composición de los medios utilizados para la obtención de los perfiles de disolución

pH	Composición
1,2	Cloruro de sodio/ácido clorhídrico
4,5	Acetato de sodio/ácido acético
6,5	Fosfato diácido de potasio/ ácido fosfórico
6,8	Fosfato diácido de potasio/ ácido fosfórico
6,8	Fosfato diácido de potasio/ ácido fosfórico/Tween 20 al 0,2%

Técnica experimental

Preparar el medio de disolución a ensayar según las indicaciones de la farmacopea¹⁴ y comprobar el pH del mismo, antes de seguir con el protocolo de trabajo, asegurándose que es el adecuado. Una vez ajustado el pH se procede a desgasificar el medio de disolución mediante filtración a vacío a través de un filtro Milipore tipo HNWP de nylon de 0.45 μm , con agitación magnética durante 10 minutos.

Introducir en cada vaso del aparato de disolución 900 ml del medio anteriormente preparado y calentarlo a 37 ± 5 °C. Cuando todos los vasos tienen la temperatura adecuada, se coloca una unidad posológica de la formulación a ensayar en el fondo de cada uno de los envases e, inmediatamente, se pone el equipo en marcha a una velocidad de 50 rpm. El perfil de disolución se inicia al comenzar la agitación (tiempo cero).

Para la realización de los perfiles de disolución, los tiempos de muestreo fueron los siguientes: 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120 y 150 minutos. En cada uno de estos tiempos se efectuó la toma de muestra del medio de disolución en una zona equidistante entre la superficie del mismo y la parte superior de la paleta, a 10 mm como mínimo de la pared del envase. Se cogieron muestras de 1 ml y después de cada toma se devolvió un volumen igual del medio ensayado para mantener constante el volumen del medio de disolución.

Las muestras obtenidas se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 minutos y se diluyeron en una proporción 1:1 con el medio de disolución correspondiente, cogiendo 500 μl de la muestra que contenía el PA y 500 μl del medio de disolución. Para los fármacos de baja solubilidad, como es el caso del Candesartan, la dilución es necesaria para evitar la precipitación del principio activo a temperaturas inferiores a 37 °C.

Comparación de perfiles de disolución

Para determinar que la velocidad de disolución del fármaco desde la formulación test es similar a la de referencia, se recomienda una comparación

de perfiles de disolución realizada bajo condiciones idénticas para las dos formulaciones. Los perfiles de disolución se pueden considerar similares en razón de similitud global de los perfiles y similitud en cada punto temporal del perfil de disolución de la formulación. La comparación de perfiles de disolución se puede realizar utilizando un método independiente de modelo o dependiente del mismo.

Si tanto la formulación test como la de referencia muestran una disolución superior al 85% en 15 minutos, los perfiles de disolución pueden ser aceptados como similares sin una evaluación matemática adicional. En caso contrario, la similitud entre los perfiles de disolución de las dos formulaciones debe calcularse usando la siguiente ecuación que define al factor de similitud (f2):

$$f2 = 50 \times \log \frac{100}{\sqrt{\left(1 + \left(\frac{\sum_{t=1}^n [Rt - Tt]^2}{n}\right)\right)}}$$

El factor de similitud (f2) es un método independiente de modelo que se usa para comparar los perfiles de disolución. Es una medición de la similitud en la disolución porcentual entre las dos curvas, donde n es el número de puntos temporales que se comparan, Rt es el porcentaje de fármaco disuelto desde la formulación de referencia a tiempo t y Tt es el porcentaje de fármaco disuelto desde la formulación test a tiempo t.

La EMA y la FDA proponen un procedimiento específico para determinar el factor de similitud:

1. Determinar los perfiles de disolución de la formulación test y referencia.
2. Utilizando los valores de disolución medios de ambas curvas en cada intervalo temporal, calcular el factor de similitud (f2) usando la ecuación que figura arriba.
3. Para que los perfiles se consideren similares, los valores de f2 deben estar cerca de 100; por lo general, valores de f2 comprendidos entre 50 y 100 asegura la equivalencia de las dos curvas.

La EMA propone las siguientes condiciones para la evaluación del factor de similitud:

- Este método es más conveniente para la comparación de los perfiles de disolución cuando hay tres o más puntos temporales de disolución disponibles.
- Los puntos temporales de disolución deberán ser los mismos para las dos formulaciones y las mediciones de disolución de las tandas test y referencia deberán realizarse bajo exactamente las mismas condiciones.
- Sólo se deberá considerar una medición después de la disolución del 85% de ambas formulaciones.
- Para permitir el uso de datos medios, la desviación estándar relativa o el coeficiente de variación debe ser inferior al 20% en el punto temporal más temprano, e inferior al 10% desde el segundo hasta el último punto temporal.

VALORACIÓN DE MUESTRAS

Las muestras obtenidas fueron valoradas por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*), con detección de fluorescencia. Se trata de una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

El sistema cromatográfico utilizado ha sido un Sistema Alliance™ HPLC, que consta de los siguientes módulos:

- Bomba cuaternaria e inyector automático integrado
- Módulo de Separaciones Waters™ 2695
- Detector de absorbancia Waters™ 2487 doble λ
- Detector programable de fluorescencia Waters 2475
- Registrador-integrador Empower™

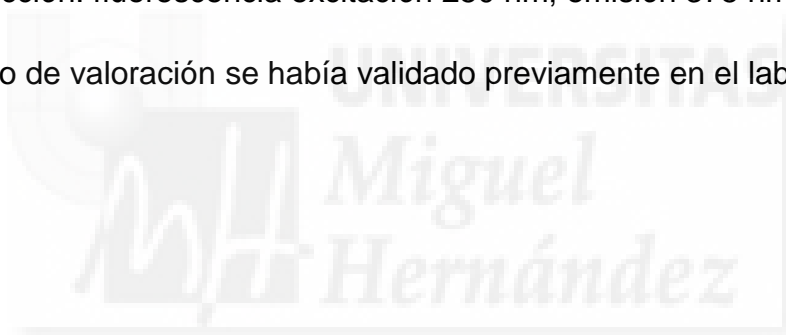
En cuanto a las condiciones cromatográficas, se utilizó una fase estacionaria inversa compuesta por una precolumna phenomenex™ KJ0-4282, con dos filtros de 2 µm y relleno con micropartículas C-18 de 40 µm de tamaño y una columna de acero inoxidable Waters™ modelo Nova Pak C-18 de 150 mm de longitud, 3.9 mm de diámetro y tamaño de partícula de 4 µm.

Como fase móvil se utilizó una mezcla de acetonitrilo, solución acuosa de tampón fosfato 0,02 M y trietilamina en una proporción volumétrica 60:40:0,2.

Características de la fase móvil:

- Flujo: 1,0mL/min
- Temperatura de la columna: 30°C
- Tiempo de retención: 4,5 minutos
- Detección: fluorescencia excitación 250 nm; emisión 375 nm

Este método de valoración se había validado previamente en el laboratorio.



RESULTADOS

Perfiles de disolución a pH 1,2

En la tabla 7 se presentan los valores medios de porcentajes de Candesartan disuelto en el medio de disolución a pH 1,2 a cada uno de los tiempos de muestreo, la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV), para la formulación de referencia (Atacand®) y para los genéricos A y B.

Tabla 7. Porcentajes de Candesartan disuelto, de la formulación de referencia (Atacand) y de las dos formulaciones test (A y B), a los distintos tiempos de toma de muestra, en un medio de disolución a pH 1,2.

Tiempo (minutos)	Referencia			Genérico A			Genérico B		
	% fármaco disuelto	SD	CV	% fármaco disuelto	SD	CV	% fármaco disuelto	SD	CV
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,79	0,03	3,26	0,27	0,02	5,92	1,11	0,08	7,14
10	0,82	0,06	7,64	0,50	0,03	5,99	1,25	0,09	6,85
15	0,82	0,06	7,72	0,47	0,01	2,41	1,11	0,05	4,36
20	0,83	0,04	5,14	0,48	0,01	1,70	1,25	0,05	3,71
30	0,86	0,03	3,80	0,46	0,03	6,51	1,27	0,04	3,43
45	0,76	0,05	7,17	0,44	0,04	8,81	1,27	0,05	3,60
60	0,77	0,01	1,06	0,47	0,05	10,19	1,25	0,02	1,61
90	0,75	0,03	4,10	0,55	0,01	2,69	1,27	0,08	6,48
120	1,00	0,03	2,76	0,46	0,01	3,12	1,28	0,08	6,20
150	0,80	0,06	7,41	0,60	0,01	1,59	1,28	0,03	2,48

La figura 10 muestra las representaciones gráficas de los perfiles de disolución de las tres formulaciones ensayadas a pH 1,2.

Figura 10. Perfiles de disolución de la formulación de referencia y las formulaciones test ensayadas en un medio de disolución a pH 1,2.

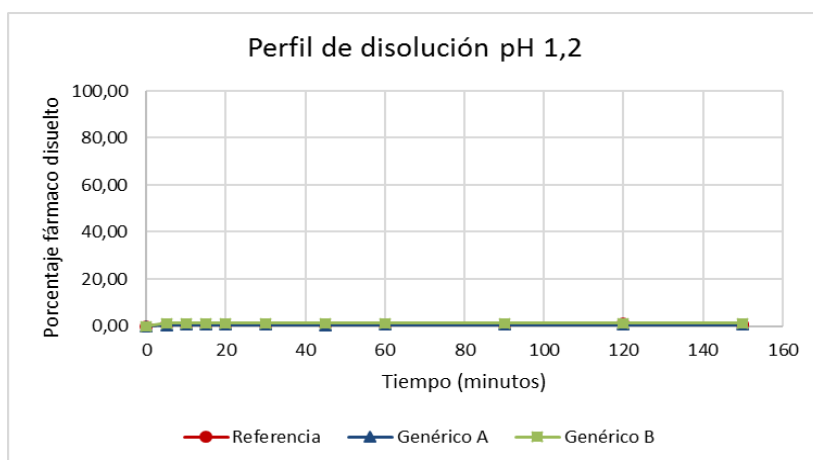


Tabla 8. Comparación de los perfiles de disolución a pH 1,2 mediante el factor de similitud f_2

Perfiles comparados	Valor f_2	Similitud perfiles
Ref.-A	98.7	SIMILARES
Ref.-B	98.4	SIMILARES

Perfiles de disolución a pH 4,5

La tabla 9 recoge los valores medios de porcentajes de Candesartan disuelto en el medio de disolución a pH 4,5 a cada uno de los tiempos de muestreo, la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV), para la formulación de referencia (Atacand®) y para los genéricos A y B.

Tabla 9. Porcentajes de Candesartan disuelto, de la formulación de referencia (Atacand) y de las formulaciones test (A y B), a los distintos tiempos de toma de muestra, en un medio de disolución a pH 4,5.

Tiempo (minutos)	Referencia			Genérico A			Genérico B		
	% fármaco disuelto	SD	CV	% fármaco disuelto	SD	CV	% fármaco disuelto	SD	CV
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	2,57	0,10	3,87	2,12	0,10	4,88	3,12	0,31	9,83
10	3,68	0,06	1,55	2,46	0,23	9,42	4,09	0,40	9,78
15	4,35	0,09	2,00	2,77	0,25	8,85	4,57	0,30	6,54
20	4,57	0,24	5,20	2,87	0,11	3,80	5,12	0,48	9,43
30	4,00	0,20	5,07	2,57	0,09	3,33	5,13	0,36	7,01
45	3,99	0,11	2,86	2,79	0,06	2,08	5,35	0,22	4,08
60	4,12	0,08	1,97	2,88	0,10	3,32	5,46	0,56	10,31
90	3,79	0,07	1,93	2,88	0,16	5,58	5,57	0,36	6,54
120	3,79	0,06	1,48	2,57	0,07	2,79	5,66	0,50	8,77
150	4,00	0,09	2,28	2,88	0,16	5,51	5,88	0,11	1,83

La figura 11 refleja las representaciones gráficas de los perfiles de disolución de las tres formulaciones ensayadas a pH 4,5.

Figura 11. Perfiles de disolución de la formulación de referencia y las formulaciones test ensayadas en un medio de disolución a pH 4,5.

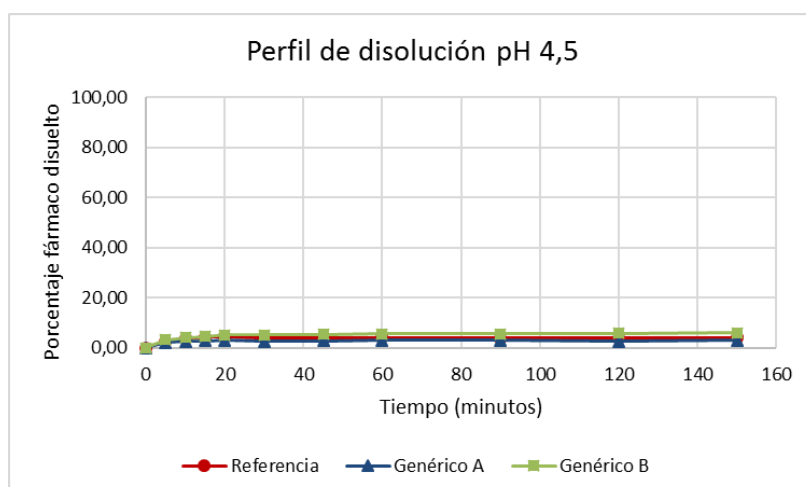


Tabla 10. Comparación de los perfiles de disolución a pH 4,5 mediante el factor de similitud f_2

Perfiles comparados	Valor f_2	Similitud perfiles
Ref.-A	90,4	SIMILARES
Ref.-B	90,3	SIMILARES

Perfiles de disolución a pH 6,5

En la tabla 11 se muestran los valores medios de porcentajes de Candesartan disuelto en el medio de disolución a pH 6,5 a cada uno de los tiempos de muestreo, la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV), para la formulación de referencia (Atacand®) y para los genéricos A y B.

Tabla 11. Porcentajes de Candesartan disuelto, de la formulación de referencia (Atacand) y de las dos formulaciones test (A y B), a los distintos tiempos de toma de muestra, en un medio de disolución a pH 6,5.

Tiempo (minutos)	Referencia			Genérico A			Genérico B		
	% fármaco disuelto	SD	CV	% fármaco disuelto	SD	CV	% fármaco disuelto	SD	CV
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	2,68	0,12	4,41	2,11	0,21	9,75	4,79	0,36	7,53
10	3,47	0,23	6,49	2,68	0,10	3,69	7,12	0,54	7,54
15	3,35	0,03	0,79	3,00	0,24	7,91	7,46	0,66	8,86
20	3,46	0,13	3,87	2,68	0,21	7,98	8,68	0,78	9,03
30	3,67	0,03	0,95	2,88	0,23	7,96	8,68	0,24	2,80
45	3,67	0,04	1,03	3,00	0,13	4,21	8,98	0,48	5,31
60	3,68	0,08	2,12	2,79	0,12	4,48	8,79	0,53	6,03
90	3,76	0,04	1,06	2,79	0,25	9,03	9,00	0,71	7,88
120	3,77	0,05	1,40	2,79	0,25	8,98	8,99	0,44	4,90
150	3,78	0,15	4,03	2,79	0,04	1,53	8,68	0,23	2,67

La figura 12 muestra las representaciones gráficas de los perfiles de disolución de las tres formulaciones ensayadas a pH 6,5.

Figura 12. Perfiles de disolución de la formulación de referencia y las formulaciones test ensayadas en un medio de disolución a pH 6,5.

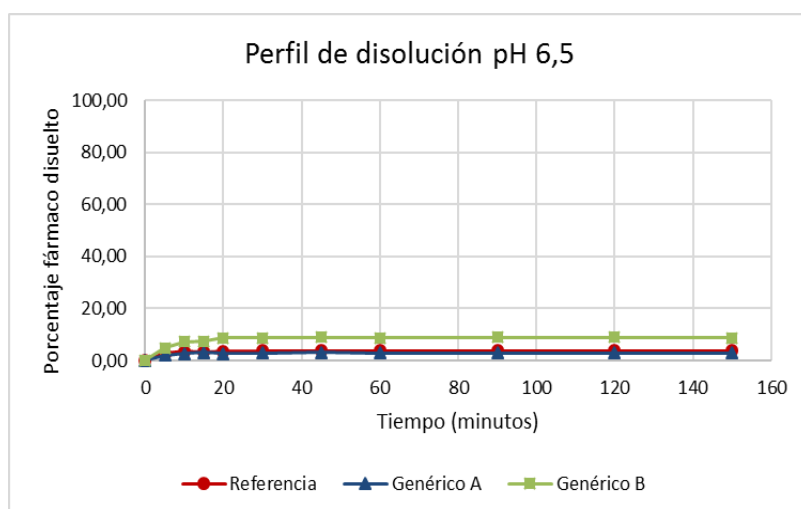


Tabla 12. Comparación de los perfiles de disolución a pH 6,5 mediante el factor de similitud f_2

Perfiles comparados	Valor f_2	Similitud perfiles
Ref.-A	95,0	SIMILARES
Ref.-B	66,9	SIMILARES

Perfiles de disolución a pH 6,8

La tabla 13 recoge los valores medios de porcentajes de Candesartan disuelto en el medio de disolución a pH 6,8 a cada uno de los tiempos de muestreo, la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV), para la formulación de referencia (Atacand®) y para los genéricos A y B.

Tabla 13. Porcentajes de Candesartan disuelto, de la formulación de referencia (Atacand) y de las dos formulaciones test (A y B), a los distintos tiempos de toma de muestra, en un medio de disolución a pH 6,8.

Tiempo (minutos)	Referencia			Genérico A			Genérico B		
	% fármaco disuelto	SD	CV	% fármaco disuelto	SD	CV	% fármaco disuelto	SD	CV
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	2,17	0,13	5,85	1,77	0,17	9,53	6,12	0,49	7,99
10	2,78	0,15	5,28	1,88	0,12	6,61	11,12	0,74	6,64
15	3,00	0,05	1,79	1,43	0,07	4,74	11,12	0,62	5,53
20	3,00	0,06	2,06	1,60	0,05	3,25	11,57	0,42	3,64
30	3,21	0,05	1,49	1,78	0,06	3,60	11,73	1,02	8,65
45	3,25	0,07	2,04	2,11	0,08	3,86	11,99	0,59	4,91
60	3,26	0,07	2,10	2,11	0,08	4,00	12,20	0,64	5,22
90	3,50	0,04	1,04	2,22	0,06	2,49	12,58	0,87	6,95
120	3,44	0,08	2,29	2,48	0,22	8,97	12,23	1,07	8,76
150	3,56	0,09	2,47	2,60	0,15	5,93	11,99	1,11	9,24

La figura 13 refleja las representaciones gráficas de los perfiles de disolución de las tres formulaciones ensayadas a pH 6,8.

Figura 13. Perfiles de disolución de la formulación de referencia y las formulaciones test ensayadas en un medio de disolución a pH 6,8.

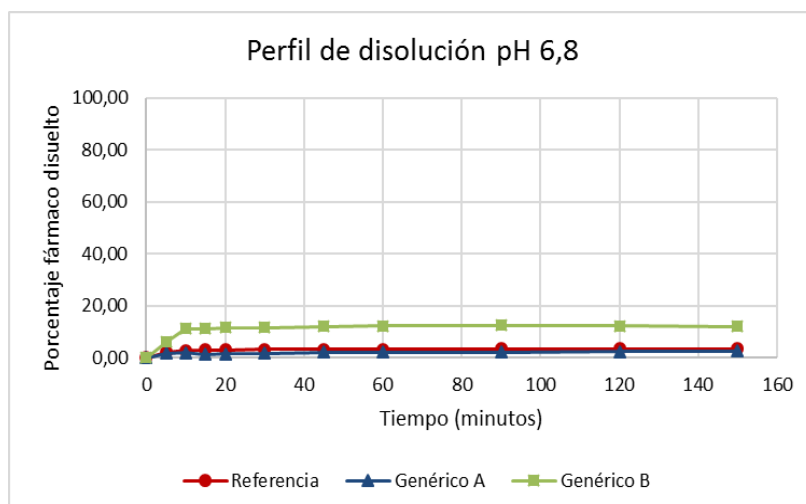


Tabla 14. Comparación de los perfiles de disolución a pH 6,8 mediante el factor de similitud f_2

Perfiles comparados	Valor f_2	Similitud perfiles
Ref.-A	91,3	SIMILARES
Ref.-B	55,0	SIMILARES

Perfiles de disolución a pH 6,8+Tween 20 al 0,2%

La tabla 15 recoge los valores medios de porcentajes de Candesartan disuelto en el medio de disolución a pH 6,8 + Tween 20 al 0,2%, a cada uno de los tiempos de muestreo, la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV), para la formulación de referencia (Atacand®) y para los genéricos A y B.

Tabla 15. Porcentajes de Candesartan disuelto, de la formulación de referencia y las dos formulaciones genéricas, a los distintos tiempos de toma de muestra, en un medio de disolución a pH 6,8+Tween 20 al 0,2%.

Tiempo (minutos)	Referencia			Genérico A			Genérico B		
	% fármaco disuelto	SD	CV	% fármaco disuelto	SD	CV	% fármaco disuelto	SD	CV
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	32,69	1,31	4,00	24,69	1,04	4,22	41,25	3,05	7,40
10	56,68	3,04	5,37	38,70	2,10	5,42	64,47	2,03	3,15
15	70,58	3,12	4,43	55,70	3,13	5,61	77,68	4,28	5,51
20	77,88	2,04	2,61	62,80	3,14	5,00	85,46	5,29	6,19
30	89,69	4,11	4,58	78,68	3,19	4,06	94,69	4,56	4,81
45	95,59	4,15	4,34	87,46	1,06	1,21	99,24	5,23	5,27
60	100,00	3,13	3,13	95,59	2,12	2,21	102,24	6,16	6,03
90	102,35	3,13	3,06	99,69	4,13	4,14	103,22	5,26	5,09
120	103,57	1,10	1,06	102,57	4,03	3,93	103,69	2,80	2,70
150	105,70	2,17	2,05	103,99	2,02	1,94	104,00	1,23	1,18

La figura 14 muestra las representaciones gráficas de los perfiles de disolución de las tres formulaciones ensayadas a pH 6,8 + Tween 20 al 0,2%.

Figura 14. Perfiles de disolución de la formulación de referencia y las formulaciones test ensayadas en un medio de disolución a pH 6,8+Tween 20 al 0,2%.

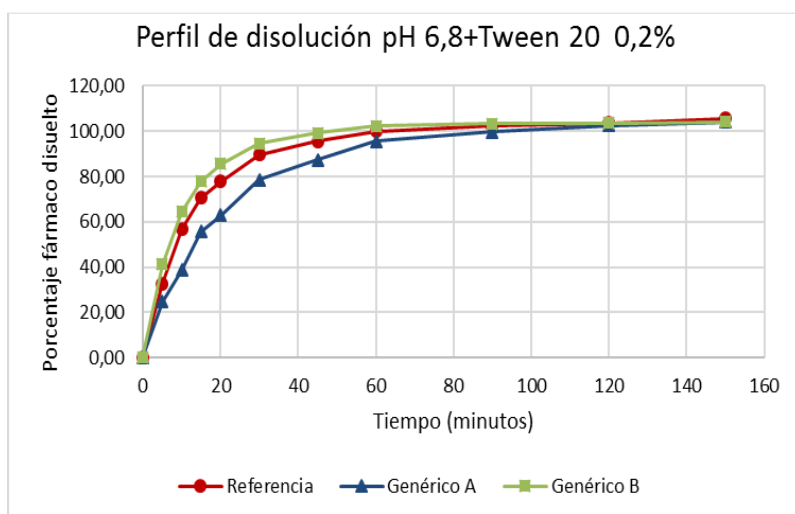


Tabla 16. Comparación de los perfiles de disolución a pH 6,8 + Tween 20 al 0,2% mediante el factor de similitud f₂

Perfiles comparados	Valor f ₂	Similitud perfiles
Ref.-A	44,9	DIFERENTES
Ref.-B	57,7	SIMILARES

DISCUSIÓN

Candesartán cilexetilo es un ácido débil (pK_a 6.0)²⁵ con una solubilidad acuosa muy baja. Esto hace que la disolución del PA en el tracto GI sea el principal factor limitativo de la absorción, cuando se administra por vía oral en una forma de dosificación sólida. Por lo tanto, los ensayos de disolución *in vitro* podrían ser una herramienta de gran utilidad para predecir el comportamiento *in vivo* de este tipo de fármacos. Pero para ello es necesario determinar las características del ensayo, de tal forma que estas sean lo más parecidas a las condiciones fisiológicas del tracto GI.

En el presente trabajo se ensayaron dos medicamentos genéricos frente a un medicamento de referencia, que contienen como principio activo Candesartan cilexetilo, con el objetivo de encontrar un medio de disolución que permitiera predecir los resultados observados en estudios de bioequivalencia en humanos. El ensayo se llevó a cabo en los medios de disolución estándar propuestos por la farmacopea, utilizando el aparato 2 (aparato de paleta).

Como se puede observar en las figuras que revelan los perfiles de disolución, a pHs ácidos el fármaco prácticamente no se disuelve. Esto se puede explicar por la naturaleza del PA. Al tratarse de un ácido débil, Candesartán cilexetilo tiene una solubilidad muy baja a pHs ácidos, que va aumentando a medida que aumenta el pH del medio de disolución, como consecuencia de la desprotonación del grupo tetrazol a pHs superiores a 6.

A pH 1,2 y 4,5 los porcentajes de fármaco disuelto son muy bajos y los perfiles de disolución aparecen prácticamente superpuestos, con valores de f_2 muy cercanos a 100 (tablas 8 y 10). Por lo tanto, estos medios no son suficientemente discriminativos y no se pueden utilizar como predictivos del comportamiento *in vivo*.

A pH 6,5 y 6,8 se observa un ligero aumento en el porcentaje de fármaco disuelto. Sin embargo, los perfiles de disolución no se ordenan según los estudios *in vivo* reflejados en la figura 7, por lo que estos medios no se pueden utilizar como medios biopredictivos.

Los resultados obtenidos indican que para algunos fármacos de baja solubilidad no se puede obtener una disolución adecuada con soluciones acuosas tamponadas, aunque estas estén dentro de intervalos de pH fisiológico. Como se ha comentado anteriormente, el pH no es el único factor que puede influir en la disolución de los fármacos. En el ambiente del tracto GI hay otros compuestos que podrían repercutir en este proceso.

Para aumentar la solubilidad de los fármacos y simular mejor las condiciones fisiológicas, se puede usar una solución acuosa que contiene un tensioactivo. Los tensioactivos comúnmente utilizados incluyen lauril sulfato sódico (LSS), monolaurato de polioxietilensorbitano (Tween), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), aceite de ricino hidrogenado (Cremophor), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB), éter de glicol de polietileno actilfenilo (Triton), nonilfenol etoxilado (Tergitol), ciclodextrinas y lecitina¹⁰. En general, los detergentes no iónicos (por ejemplo, Tween) se consideran más relevantes desde el punto de vista biológico, y suelen ser la primera opción cuando se considera la adición de un tensioactivo al medio de disolución.

En este trabajo, se seleccionó el tensioactivo Tween 20 y se adicionó al medio de disolución a pH 6,8 en una concentración al 0,2%. Como se puede observar en la figura 14, la adición del tensioactivo aumenta considerablemente la solubilidad del PA, llegándose a una disolución completa de las tres formulaciones.

Sin embargo, esto no es lo que ocurre *in vivo*. Según los datos obtenidos en voluntarios sanos, las concentraciones máximas de los genéricos A y B con respecto al fármaco de referencia son del 86% y 89%, respectivamente (figura 7). Por lo tanto, los porcentajes de fármaco disuelto en el tracto gastrointestinal no pueden ser superiores a estos valores.

El alto porcentaje de fármaco disuelto en el medio a pH 6,8 + Tween se debe a la concentración del tensioactivo adicionado, que ha provocado una solubilización del fármaco superior a la del tracto GI. Probablemente, un ajuste en la concentración del tensioactivo podría llevar a condiciones más parecidas a las fisiológicas.

En cuanto a los perfiles de disolución obtenidos en este medio, éstos no se ordenan según los datos *in vivo*. El perfil de disolución del genérico B está por encima del perfil del medicamento de referencia y, además, el valor de f2 del genérico A indica que este no es bioequivalente al medicamento de referencia, lo cual no concuerda con los resultados obtenidos en humanos. Por tanto, este medio de disolución tampoco refleja del comportamiento *in vivo* del fármaco y no se puede usar como medio biopredictivo.

La actividad enzimática y la presencia de alimentos en el tracto GI, son otros factores que pueden influir en el proceso de disolución de fármacos. Su importancia ha impulsado la investigación en los últimos años y ha llevado al desarrollo de los medios biorrelevantes, capaces de simular los fluidos gástricos e intestinales en ayunas o en presencia de alimentos^{3,11}.

Estos medios simulan de forma más fisiológica las condiciones del tracto GI. Su utilización tiene especial interés en los fármacos cuyo rendimiento *in vivo* depende del proceso de disolución, como es el caso del Candesartan cilexetilo. Es por ello que sería interesante ensayar estos medios en estudios futuros con este PA.

CONCLUSIONES

- Se han realizado los perfiles de disolución según las indicaciones de la farmacopea, de la formulación comercial Atacand® y de las formulaciones genéricas A y B, con los tampones estándar a pH fisiológico. En estos medios de disolución el fármaco apenas se disuelve y, por tanto, no han resultado ser biopredictivos del comportamiento *in vivo*.

- Se han seleccionado nuevos medios descritos en la bibliografía tales como medios con tensioactivos (LSS y Tween 20), medios con menor fuerza iónica, FaSSIF y FaSSGF.

- Se determinaron los perfiles de disolución de las formulaciones con el medio a pH= 6.8, adicionado de 0,2% de Tween 20. La comparación de dichos perfiles determinó que este nuevo medio permitía alcanzar el 100% de la disolución del principio activo, pero no era capaz de predecir el comportamiento que se había observado en los ensayos *in vivo*.

Los resultados obtenidos indican que es necesario continuar con la búsqueda del resto de los medios propuestos, con medios más discriminativos o con sistemas de disolución diferentes que permitan establecer correlaciones *in vitro-in vivo*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability; WHO Technical Report Series, No. 937, Annex 7; World Health Organization: Geneva, 2006.
2. Macheras P, Karalis V, Valsami G. Keeping a Critical Eye on the Science and the Regulation of Oral Drug Absorption: A Review. *J Pharm Sci.* 2013;102(9):3018-36. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jps.23534>
3. Klein S. The Use of Biorelevant Dissolution Media to Forecast the In Vivo Performance of a Drug. *AAPS Journal.* 2010;12(3):397-406. DOI: 10.1208/s12248-010-9203-3
4. FDA. Guidance for industry: dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms. Rockville MD, USA: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER); 1997.
5. Ley 29/2006, de 26 de julio, de Garantías y Uso Racional de los Medicamentos y Productos Sanitarios (Artículo 8). (Boletín Oficial del Estado, núm. 178, de 27-07-2006).
6. Aeseg. Asociación Española de Medicamentos Genéricos [sede Web]. Madrid, España. Disponible en: <http://www.aeseg.es/es/>
7. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on the investigation of bioequivalence. London; 2010. Doc. Ref.: CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1/ Corr **.
8. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutics drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res.* 1995;12(3):413-20. PMID: 7617530
9. Yardi S, Hitoshi, Hidehisa T. Developing In Vitro–In Vivo Correlation of Risperidone Immediate Release Tablet. *AAPS PharmSciTech.* 2012;13(3):890–5. DOI: 10.1208/s12249-012-9814-3
10. Brown CK, Chokshi HP, Nicherson B, Reed RA, Rohrs BR, Shah PA. Acceptable analytical practices of dissolution testing of poorly soluble compounds. *Pharm Technol.* 2004; 56–65.
11. Fotaki N, Vertzoni M. Biorelevant dissolution methods and their applications in in vitro-in vivo correlations for oral formulations. *Open Drug Delivery J.* 2010;4 (1),2-13. DOI: 10.2174/1874126601004010002

12. Kaur P, Jiang X, Duan J, Stier E. Applications of In Vitro-In Vivo Correlations in Generic Drug Development: Case Studies. AAPS J. 2015;17(4):1035-9. DOI: 10.1208/s12248-015-9765-1
13. Sakore S, Chakraborty B. In Vitro–In Vivo Correlation (IVIVC): A Strategic Tool in Drug Development. J Bioequiv Availab. 2011;S3. DOI: 10.4172/jbb. S3-001.
14. Real Farmacopea Española 3ª Ed. Boletín Oficial del Estado. Madrid, 2005. ISBN: 84-340-1585-4
15. SMI-LabHut Ltd. Quality Lab Accessories LLC [sede Web]. Telford, USA. Disponible en: <https://goo.gl/GZVDMI>
16. Pharma Learners [sede Web]. Disponible en: <https://goo.gl/zNhxA5>
17. Drug Future [sede Web]. British Pharmacopoeia Volume IV; Appendix XII B Dissolution. Disponible en: <https://goo.gl/CjwiCh>
18. Klein S. Biorelevant Dissolution-Concepts and Application. Disponible en: <https://goo.gl/xFVivl>
19. Food and Drug Administration. Candesartan Cilexetil-HCTZ-NDA 21-093, Item 13: Patent Information and Certification. Disponible en: <https://goo.gl/OQdwxR>
20. Drugs.com. Generic Atacand Availability [sede Web]. [Marzo 2017; Abril 2017]. Disponible en: <https://goo.gl/UutMUc>
21. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Ficha técnica “Atacand Plus Forte 32 mg/25 mg comprimidos”. [Mayo 2016; Marzo 2017]. Disponible en: <https://goo.gl/tsGO3m>
22. Dirección General para la Prestación Farmacéutica, Generalitat Valenciana. Medicamentos- Información y evaluación de novedades terapéuticas. Informe Nº 6. [Enero 2001; Marzo 2017]. Disponible en: <https://goo.gl/QWHqHK>
23. Pharma Test [sede Web]. Analytical Products » Tablet Dissolution » PT-DT70. Disponible en: <https://goo.gl/PhygbA>
24. Particle Sciences. In Vitro Dissolution Testing for Solid Oral Dosage Forms. Technical Brief 2010 Vol 5. Disponible en: <https://goo.gl/YHiRvV>
25. E Cagigal, L Gonzáles, RM Alonso, RM Jiménez. pKa determination of angiotensin II receptor antagonists (ARA II) by spectrofluorimetry. JPBA. 2001;26:477-86.