



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
GRADO EN FARMACIA



Correlación *In vitro*-*In vivo* para Telmisartán, un fármaco clase II según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica.

Trabajo de Fin de Grado

Bárbara Sánchez Dengra

Curso 2016/2017

Tutoras.- Marta González Álvarez y María Isabel González Álvarez

Modalidad TFG.- Experimental

Lugar presentación.- Sant Joan d'Alacant

Fecha fin trabajo.- 22/05/2017

Índice

1. <u>Resumen - Abstract</u>	3
2. <u>Introducción (antecedentes y objetivos)</u>	5
3. <u>Material y métodos</u>	10
3.1. Formulaciones empleadas	10
3.2. Ensayos <i>in vivo</i>	10
3.2.1. Método de Wagner-Nelson	11
3.2.2. Método de Loo-Riegelman	12
3.3. Ensayos <i>in vitro</i>	15
3.3.1. Medios de disolución	15
3.3.2. Aparato de disolución tipo II o de paletas	16
3.3.3. Aparato de disolución tipo IV o celda de flujo	17
3.3.4. Cálculo de f_2	19
3.3.5. Selección del modelo que mejor ajusta al perfil de disolución	20
3.4. Correlación <i>in vitro-in vivo</i>	21
4. <u>Resultados y discusión</u>	24
4.1. Ensayos <i>in vivo</i>	24
4.1.1. Estudio de perfusión intravenosa	26
4.1.2. Perfil de absorción (Wagner-Nelson o Loo-Riegelman)	26
4.2. Ensayos <i>in vitro</i>	29
4.2.1. Cálculo de f_2	29
4.2.2. Selección del modelo que mejor ajusta al perfil de disolución	32
4.3. Correlación <i>in vitro-in vivo</i>	33
4.3.1. Escalado del tiempo o Levy Plot	33
4.3.2. Recta correlación	35
4.3.3. Grado de predictibilidad	36
5. <u>Conclusiones, expectativas de futuro - Conclusions, future expectations</u>	37
6. <u>Referencias</u>	39

1. Resumen

Introducción: Una correlación *in vitro-in vivo* (IVIVC) se corresponde con aquel modelo matemático que es capaz de relacionar una característica *in vitro* de un medicamento, como la disolución, con su comportamiento biológico *in vivo*. Estas IVIVC despiertan especial interés en las industrias fabricantes de genéricos, muy abundantes en España, ya que permiten predecir el comportamiento de un medicamento *in vivo* sin necesidad de administrarlo en humanos para saber si éste es bioequivalente o no a otra formulación.

Objetivo: El objetivo principal de este trabajo es establecer una IVIVC para 3 formulaciones distintas de telmisartán, que permita relacionar los procesos de disolución y absorción.

Materiales y métodos: Los estudios *in vivo* de la correlación fueron llevados a cabo por la industria y sus resultados fueron tratados matemáticamente para obtener los perfiles de absorción. Los ensayos de disolución *in vitro* se llevaron a cabo con los aparatos de disolución tipo II y tipo IV empleando distintos medios de disolución y, posteriormente, se compararon sus resultados mediante el cálculo del factor de similitud f_2 con el fin de hallar el modelo más biopredictivo.

Resultados y discusión: Los datos *in vivo*, tras administrar las formulaciones por vía oral, se ajustaron óptimamente al modelo matemático de Loo-Riegelman, lo que indica que el comportamiento *in vivo* del telmisartán se puede describir con un modelo farmacocinético bicompartimental extravasal. El ensayo *in vitro* que reflejó de forma más precisa el comportamiento *in vivo* empleó el aparato de disolución tipo IV y medios de disolución a pH 1,2; 4,5 y 6,8 con Tween 80 al 0,05%, siguiendo el proceso de disolución un modelo de primer orden. La IVIVC se desarrolló utilizando las fracciones absorbidas (f_{abs}) y las fracciones disueltas (f_{diss}) para las distintas formulaciones estudiadas.

Conclusión: La comparación de las fracciones absorbidas (f_{abs}) con las fracciones disueltas (f_{diss}) permitió obtener una IVIVC con una r^2 de 0,92, pero con un porcentaje de error de predicción (%EP) demasiado elevado como para poder ser empleada como sustituta total de los estudios de bioequivalencia *in vivo*.

1. Abstract

Introduction: An *in vitro-in vivo* correlation (IVIVC) corresponds with a mathematical model that is able to relate to an *in vitro* characteristic of a drug, such as dissolution, to its *in vivo* biological behaviour. These IVIVC are interesting to the generic manufacturers industries, very abundant in Spain, since they allow to predict the *in vivo* behaviour of a drug without needing to administrate it in humans to know if it is bioequivalent or not to another formulation.

Aim: The main objective of this work is to establish an IVIVC for 3 different formulations of telmisartan which allows to pass from its dissolution to its absorption.

Materials and methods: The *in vivo* correlation studies were carried out by the industry and their results were mathematically treated to obtain the absorption profiles. The *in vitro* dissolution tests were done using the type II and type IV dissolution apparatus and different dissolution media and, later, the results were compared, in order to find the most bio-predictive model, calculating the f_2 similarity factor.

Results and discussion: *In vivo* data, after the oral administration of the drugs, were optimally adjusted to Loo-Riegelman mathematical model, which indicates that the telmisartan *in vivo* behaviour can be described using an extravasal bicompartamental pharmacokinetic model. The *in vitro* experiment which more accurately reflected the *in vivo* behaviour employed the type IV dissolution apparatus and the dissolution environment at pH 1.2, 4.5 and 6.8 with Tween 80 0.05%. The dissolution process follows a first order model. The IVIVC was developed using the absorbed fractions (f_{abs}) and the dissolved fractions (f_{diss}) for the different formulations studied.

Conclusion: Comparing the absorbed fractions (f_{abs}) with the dissolved fractions (f_{diss}) allowed an IVIVC with an r^2 of 0.92, but with an error prediction percentage (% EP) too high to be used as a total substitute of the *in vivo* bioequivalence studies.

2. Introducción (antecedentes y objetivos).

Según el diccionario de la Real Academia Española, una correlación puede definirse como una “correspondencia o relación recíproca entre dos o más cosas o series de cosas” y/o, desde el punto de vista de la Economía y las Matemáticas, como una “medida de la dependencia existente entre variables aleatorias”¹. Así pues, una correlación *in vitro-in vivo* (IVIVC) se corresponde con aquel modelo matemático que es capaz de relacionar una característica *in vitro* de un medicamento (propiedades de la forma farmacéutica como la velocidad de disolución) con el comportamiento biológico, *in vivo*, del mismo (concentraciones plasmáticas o fracciones absorbidas del fármaco a lo largo del tiempo)^{2,3}.

En los últimos años, las IVIVC han cobrado especial interés y se han publicado diversos artículos sobre las mismas^{4,5,6}, ya que, establecer buenas IVIVC permitiría simplificar el desarrollo de nuevos medicamentos y las modificaciones en la formulación de medicamentos ya existentes, pues a partir de los datos de un ensayo de disolución *in vitro* se podría predecir el comportamiento *in vivo*, reduciéndose, de este modo, el tiempo, el dinero y los problemas éticos derivados de los ensayos farmacocinéticos preclínicos y clínicos llevados a cabo en animales y humanos.

La Guía para la industria de la Food and Drug Administration de los EE.UU. (FDA)², divide las IVIVC en cuatro niveles: A, B, C y C múltiple, cuyo interés a nivel regulatorio varía según su exactitud y su grado de predictibilidad.

- Nivel A de correlación.- En este tipo de correlaciones se establece una relación punto a punto entre el perfil de disolución *in vitro* y la absorción *in vivo*. Por ello, éste es el nivel más alto de correlación y se considera el más útil desde el punto de vista predictivo, pudiéndose utilizar como sustituto de los ensayos *in vivo* en controles de calidad entre lotes, para justificar que dos formulaciones son bioequivalentes tras pequeños cambios en el proceso de fabricación o, incluso, para realizar cambios en la dosis del fármaco sin modificar la formulación^{7,8}.

- Nivel B de correlación.- Estas correlaciones, consideradas de baja utilidad desde el punto de vista regulatorio, comparan un parámetro medio de los datos *in vitro* con un parámetro medio del perfil *in vivo*. Su escaso interés deriva de que, al comparar un solo parámetro de cada perfil, la correlación obtenida no representa de forma exacta el perfil completo de absorción *in vivo* y, además, ésta puede variar según el parámetro medio seleccionado^{7,8}.
- Nivel C de correlación.- En este caso, la IVIVC se obtiene comparando un solo punto de los perfiles *in vitro* e *in vivo*. Por esta razón, sus predicciones tienen escasa validez y, al igual que las correlaciones de nivel B, se consideran poco útiles^{7,8}.
- Nivel C múltiple de correlación.- Este último nivel de correlación, versión ampliada del nivel C, relaciona varios parámetros de los perfiles *in vitro* e *in vivo* a distintos tiempos. Por lo que, sus correlaciones pueden llegar a ser tan útiles como las correlaciones de nivel A. Sin embargo, se prefiere utilizar correlaciones tipo A, pues si una IVIVC nivel C múltiple puede desarrollarse, una nivel A también puede establecerse^{7,8}.

No obstante, a pesar de las ventajas que radican del desarrollo de IVIVCs, no todos los fármacos poseen las características que los hacen idóneos para llevar a cabo una correlación. Con el fin de conocer qué fármacos son susceptibles para establecer una IVIVC, se debe recurrir al Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS)⁹.

El BCS divide los fármacos en 4 grupos en función de su solubilidad y su permeabilidad (Tabla 1), considerándose que la solubilidad será alta si la dosis máxima del fármaco a ensayar se disuelve completamente en 250 mL y la permeabilidad será alta si la fracción absorbida es mayor o igual al 90%, según la FDA¹⁰, o al 85%, según la Agencia Europea del Medicamento (EMA)¹¹.

Tabla 1. Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS)

Clase	Solubilidad	Permeabilidad
I	Alta	Alta
II	Baja	Alta
III	Alta	Baja
IV	Baja	Baja

Con ayuda de esta clasificación pueden establecerse los factores limitantes del proceso de absorción *in vivo* y puede definirse en qué casos será posible obtener una IVIVC⁹.

- Clase I.- En este grupo, los fármacos tienen alta solubilidad y alta permeabilidad, por lo que el paso limitante en el proceso de absorción puede ser la velocidad de disolución o el tiempo de vaciado gástrico.
 - Será posible obtener una IVIVC, sólo cuando la velocidad de disolución sea el factor limitante, es decir, sea más lenta que el vaciado gástrico.
 - Si la velocidad de disolución es mayor que el tiempo de vaciado gástrico, el factor limitante será el vaciado gástrico y la obtención de una IVIVC será poco probable, ya que en los modelos *in vitro* no se tiene en cuenta el proceso vaciado gástrico.
- Clase II.- La absorción de los compuestos con baja solubilidad y alta permeabilidad está limitada por la velocidad de disolución *in vivo*, por lo que si se establece un buen modelo *in vitro* que imite fielmente las condiciones de disolución *in vivo* será probable que pueda establecerse una IVIVC.
- Clase III.- Para estos fármacos de alta solubilidad y baja permeabilidad, al igual que en los clase I, podrá establecerse una IVIVC sólo si la velocidad de disolución es el paso limitante, es decir, la velocidad de disolución es inferior a la permeabilidad intestinal, lo cual es poco frecuente, porque como ya se ha comentado en este grupo la permeabilidad es baja.

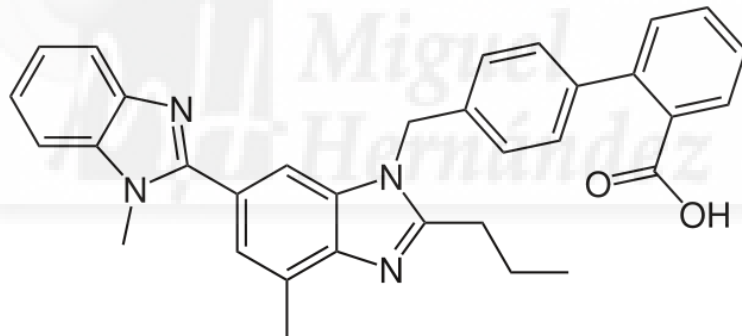
- Clase IV.- Los principios activos pertenecientes a este grupo tienen una baja solubilidad y permeabilidad, por lo que su absorción oral suele ser poco efectiva y no se pueden establecer IVIVC.

A raíz de lo dicho anteriormente, puede concluirse que los fármacos más adecuados para obtener una IVIVC nivel A serán aquellos incluidos en la clase II, como es el caso del telmisartán, principio activo utilizado en el desarrollo de este trabajo.

El telmisartán (Figura 1), es un fármaco antagonista del receptor de la angiotensina II (ARA II) indicado, en dosis de 40-80 mg/24 h, en el tratamiento de la hipertensión arterial y en la prevención de la enfermedad cardiovascular en pacientes con riesgo (diabéticos tipo 2 con lesión del órgano diana y/o pacientes con historia previa de enfermedad coronaria, ictus o enfermedad vascular periférica)¹².

Figura 1. Estructura química del telmisartán.

Fuente: Dominio público



El telmisartán bloquea el receptor AT1 al que debe unirse la angiotensina II impidiendo la acción y los efectos de la misma, lo que lleva a una disminución de la presión arterial por vasodilatación, disminución de la liberación de catecolaminas y aldosterona y reducción de la volemia. Entre las características farmacocinéticas de este fármaco cabe destacar que, además de poseer baja solubilidad y alta permeabilidad, lo que lo hace formar parte de la clase II del BCS¹³:

- Posee una rápida velocidad de absorción, con una biodisponibilidad media de entre el 42-58%¹².
- Su unión a proteínas plasmáticas es elevada (99,5%)¹².

- Se elimina mayoritariamente por heces de forma inalterada (97%)¹².
- Sólo un 11% es metabolizado por el hígado¹².
- Su farmacocinética varía en función del sexo, presentando las mujeres valores de C_{max} (concentración plasmática máxima) y de AUC (área bajo la curva) superiores a los hombres¹².

Por todo lo dicho previamente, el objetivo que se persigue con este trabajo es establecer una correlación *in vitro-in vivo* (IVIVC) clase A para varias formulaciones de telmisartán con el fin de que ésta pueda servir en el futuro como herramienta biopredictiva del comportamiento *in vivo* de nuevos medicamentos formulados con este fármaco.

En concreto, los objetivos específicos planteados en este trabajo son los siguientes:

- 1) Determinar el modelo farmacocinético que describe el comportamiento del telmisartán *in vivo*.
- 2) Determinar el medio de disolución y las características del ensayo *in vitro* que permitan predecir el comportamiento *in vivo* del telmisartán.
- 3) Desarrollar una IVIVC que sirva como herramienta para discriminar las formulaciones adecuadas para realizar el ensayo de bioequivalencia en humanos con garantías de éxito o que pueda emplearse como sustituta de algunos ensayos en humanos.

3. Material y métodos.

3.1. Formulaciones empleadas.

Para llevar a cabo este estudio se han empleado 3 formulaciones distintas, de 40 mg, del principio activo telmisartán. La primera de ellas, considerada formulación referencia, se corresponde con comprimidos de Micardis® y, las otras dos, son dos lotes test, a los que se hará referencia como X1 y X2, respectivamente.

3.2. Ensayos *in vivo*.

Como ya se ha mencionado con anterioridad, para llevar a cabo una IVIVC se debe disponer tanto de datos *in vivo* como de datos *in vitro*. Los datos de los ensayos *in vivo* fueron facilitados, confidencialmente, por las empresas que habían realizado los comprimidos.

En primer lugar, se efectuó un estudio de bioequivalencia en el que se compararon las 3 formulaciones de 40 mg de telmisartán (Micardis, X1 y X2) por vía oral y en el que, a partir de varias muestras de sangre, se obtuvieron las concentraciones plasmáticas (Cp) a lo largo del tiempo (t). La tabla 2 recoge los tiempos de toma de muestra de dicho estudio.

Tabla 2. Tiempos de toma de muestras del estudio de bioequivalencia *in vivo*: Micardis-X1-X2

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Tiempo (h)	0	0,167	0,333	0,5	0,667	0,833	1	1,167	1,333	1,583			
Muestra	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Tiempo (h)	2	2,5	3	4	6	8	10	12	16	24	36	48	72

Posteriormente, con el fin de transformar los perfiles de Cp-t en los perfiles de absorción *in vivo* necesarios para establecer la relación con la disolución *in vitro*, se emplearon dos métodos matemáticos: el método de Wagner-Nelson y el método de Loo-Riegelman. Ambos métodos, persiguen el mismo objetivo, establecer la velocidad de absorción del fármaco, no obstante, una vez analizados los datos, se deberá seleccionar aquel que mejor represente el proceso de absorción.

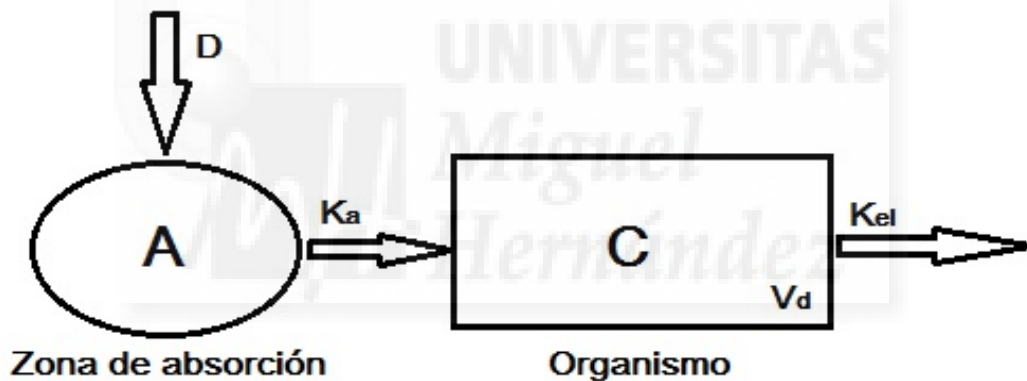
3.2.1. Método de Wagner-Nelson.

El método de Wagner-Nelson, también conocido como balance de masas, se emplea para modelizar el proceso de absorción de aquellos fármacos cuyo comportamiento en el organismo se puede simplificar a un modelo farmacocinético monocompartimental extravasal.

Cuando se define un modelo monocompartimental extravasal (Figura 2), la complejidad del organismo humano se reduce a dos compartimentos: uno externo, que se corresponde con el lugar de absorción, y uno interno, el organismo¹⁴.

Figura 2. Esquema representativo del modelo monocompartimental extravasal.

Modificada de: Doménech Berrozpe J, Martínez Lanao J, Peraire Guitart C. Tratado General de Biofarmacia y Farmacocinética. Volumen I. LADME. Análisis Farmacocinético. Biodisponibilidad y bioequivalencia.



D: Dosis administrada, k_a : constante de absorción, k_{el} : constante de eliminación, V_d : volumen de distribución, A: concentración de fármaco en la zona de absorción, C: concentración del fármaco en el organismo.

A partir del esquema anterior, puede definirse la ecuación diferencial que representa la variación de la concentración de fármaco en el organismo a lo largo del tiempo (ecuación 1). Esta variación depende de dos procesos: la velocidad a la que entra el fármaco al organismo desde la zona de absorción ($k_a \cdot A$) y la velocidad a la que el fármaco desaparece del organismo ($-k_{el} \cdot C$).

$$\frac{dC}{dt} = (k_a \cdot A) - (k_{el} \cdot C) \quad (1)$$

El método de Wagner-Nelson, permite obtener el valor de la constante k_a a partir de datos C-t. Para ello, toma como premisa que la cantidad absorbida a tiempo infinito (A_∞) es igual a la cantidad eliminada (E_∞), es decir, para un tiempo dado, la cantidad absorbida (A_t) será igual al sumatorio de la cantidad eliminada a dicho tiempo (E_t) y la cantidad remanente en el organismo (C_t)¹⁴.

Teniendo en cuenta como base lo dicho anteriormente, con el desarrollo matemático del método de Wagner-Nelson, se obtendrá el valor de las fracciones absorbidas (f_a) a cada tiempo, utilizando la ecuación 2, donde A_∞ se corresponde con la última A_t .

$$f_a = \frac{A_t}{A_\infty} \cdot 100 \quad (2)$$

El perfil de fracciones absorbidas (f_a) frente al tiempo es el que, en caso de que el modelo monocompartimental extravasal sea el que mejor ajuste a los datos experimentales, se utilizará para comparar con el perfil de disolución *in vitro*.

Con el fin de poder elegir si este modelo es correcto, se representará en un gráfico el perfil f_a -t y se comprobará si las fracciones absorbidas aumentan gradualmente con el tiempo hasta alcanzar un máximo. Si esto no ocurre, se debe recurrir a otro modelo, como puede ser el bicompartimental extravasal.

3.2.2. Método de Loo-Riegelman.

El método de Loo-Riegelman, puede considerarse el equivalente a Wagner-Nelson, pero para fármacos cuyo comportamiento se ajusta a una cinética bicompartimental extravasal.

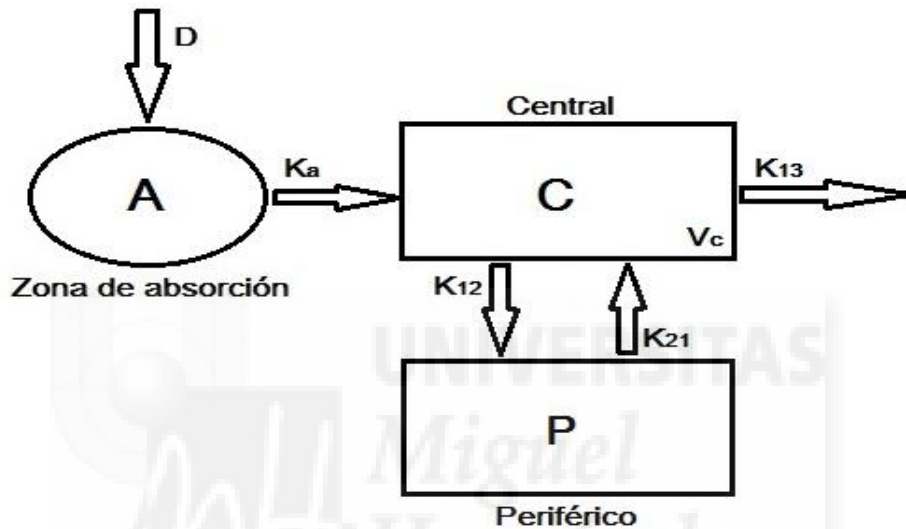
El modelo bicompartimental extravasal, divide al organismo en tres apartados: la zona de absorción, el compartimento central y el compartimento periférico¹⁴. La ecuación diferencial (ecuación 3) por la que se rige la variación de la concentración plasmática a lo largo del tiempo en este modelo depende de los cuatro procesos representados en la figura 3:

$$\frac{dC}{dt} = (k_a \cdot A) - (k_{12} \cdot C) - (k_{13} \cdot C) + (k_{21} \cdot P) \quad (3)$$

- Ganancia de fármaco por absorción ($k_a \cdot A$).
- Pérdida por distribución al compartimento periférico ($-k_{12} \cdot C$).
- Pérdida por eliminación ($-k_{13} \cdot C$).
- Ganancia por retorno del compartimento periférico al central ($k_{21} \cdot P$).

Figura 3. Esquema representativo del modelo bicompartimental extravasal.

Modificada de: Doménech Berrozpe J, Martínez Lanao J, Peraire Guitart C. Tratado General de Biofarmacia y Farmacocinética. Volumen I. LADME. Análisis Farmacocinético. Biodisponibilidad y bioequivalencia.



D: Dosis administrada, k_a : constante de absorción, k_{13} : constante de eliminación, k_{12} : constante de distribución a compartimento periférico, k_{21} : constante de retorno al compartimento central V_c : volumen de distribución en el compartimento central, A: concentración de fármaco en la zona de absorción, C: concentración del fármaco en el compartimento central, P: concentración del fármaco en el compartimento periférico.

El método de Loo-Riegelman, permite estudiar el proceso de absorción del fármaco a partir de los datos C-t y de las microconstantes, k_{12} , k_{21} y k_{13} , que se obtienen tras la administración intravenosa del fármaco. Por ello, el primer paso a seguir para aplicar Loo-Riegelman es realizar un pequeño estudio en humanos administrando una solución de principio activo por vía intravenosa. En este caso, se infundió una solución de 40 mg de telmisartán por perfusión continua intravenosa durante 30 minutos y se tomaron muestras de sangre a los tiempos recogidos en la tabla 3.

Tabla 3. Tiempos de toma de muestras en la perfusión intravenosa continua de telmisartán.

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8
Tiempo (min)	3,67	7,49	11,30	15,12	18,92	22,50	26,29	29,85

Muestra	9	10	11	12	13	14	15	16
Tiempo (min)	33,53	37,24	41,20	44,71	59,55	75,72	90,80	150,24

Con los datos obtenidos, extraídos de la figura 1 del artículo de Stangier *et al.*¹⁵, empleando el programa “GetData Graph Digitizer” V.2.26, se calcularon¹⁶, con el programa “Winonlin” V.7, las microconstantes que caracterizan el modelo bicompartimental (k_{12} , k_{21} y k_{13}).

Una vez se tienen las constantes, se puede llevar a cabo el estudio del perfil de absorción *in vivo* de Micardis®, X1 y X2 por el método de Loo-Riegelman. Para ello, debe tenerse en cuenta que Loo-Riegelman asume, de manera similar a Wagner-Nelson, que, para un tiempo dado, la cantidad absorbida (A_t) será igual al sumatorio de la cantidad eliminada a dicho tiempo (E_t), la cantidad remanente en el compartimento central (C_t) y la cantidad presente en el compartimento periférico (P_t)¹⁴. Los pasos a seguir para aplicar el método de Loo-Riegelman son, por tanto, los mismos que en el método de Wagner-Nelson, pero añadiendo las concentraciones en el compartimento periférico (P) que se calculan con la siguiente ecuación (ecuación 4):

$$P_t = k_{12} \cdot e^{-k_{21} \cdot t} \cdot \int_0^t C \cdot e^{k_{21} \cdot t} dt \quad (4)$$

Cuando ya se dispone del valor de P para los distintos tiempos el procedimiento a seguir es:

- 1) Sumar, para cada tiempo (ecuación 5), la concentración eliminada (E_t), la concentración en el compartimento central (C_t) y la concentración en el compartimento periférico (P_t), con el fin de obtener la concentración absorbida hasta el momento (A_t).

$$A_t = E_t + C_t + P_t \quad (5)$$

- 2) Transformar las A_t en fracciones absorbidas (f_a), del mismo modo que en el método de Wagner-Nelson.
- 3) Representar en un gráfico el perfil f_a-t y comprobar si las fracciones absorbidas aumentan gradualmente con el tiempo hasta alcanzar un máximo. Si es así, el modelo bicompartimental extravasal será el que mejor ajuste a los datos experimentales y se utilizará para comparar con el perfil de disolución *in vitro*.

3.3. Ensayos *in vitro*.

Los ensayos *in vitro* necesarios para realizar una IVIVC son estudios de disolución en los que se mide la cantidad de fármaco disuelto a distintos tiempos.

Estos ensayos, en los que se comparan los perfiles de disolución de Micardis®, X1 y X2, fueron llevados a cabo por el grupo de investigación de “Optimización biofarmacéutica y disolución biopredictiva” del Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica del Departamento de Ingeniería de la Universidad Miguel Hernández, empleando 2 tipos de aparato de disolución (el aparato tipo II y el aparato tipo IV) y distintos medios de disolución que trataban de imitar el tracto gastrointestinal.

3.3.1. Medios de disolución.

Con el fin de abarcar todo el rango de pH del tracto gastrointestinal, la velocidad de disolución *in vitro* de las 3 formulaciones se estudió en un total de 7 medios:

- Los 3 medios descritos en la Farmacopea Europea¹⁷: tampón clorhídrico a pH 1,2, tampón acetato a pH 4,5 y tampón fosfato a pH 6,8.
- Los mismos 3 medios a los que se adicionó Tween 80 al 0,05%.
- El medio biorrelevante FaSSIF (fasted state simulating intestinal fluid) que, como su nombre indica, trata de simular las condiciones del intestino en ayunas y cuya composición se recoge en la tabla 4.

Tabla 4. Composición del medio biorrelevante FaSSIF.

FaSSIF pH 1,6	
Taurocolato sódico	3 mM
Lecitina	0,75 mM
NaH ₂ PO ₄	3,438 g
NaCl	6,186 g
NaOH	c.s.p. pH 6,5
Agua desionizada	c.s.p. 1 L

3.3.2. Aparato de disolución tipo II o de paletas.

El aparato de disolución tipo II o de paletas (figura 4) y los ensayos de disolución llevados a cabo en el mismo, deben cumplir los requisitos que recoge el documento para la armonización de las farmacopeas europea, estadounidense y japonesa¹⁸.

Figura 4. Aparato de disolución tipo II.

Fuente: Web de DirectIndustry¹⁹.



El aparato consta de 7 vasos de cristal transparente con una capacidad de 900 mL, sumergidos en un baño termostático cuya temperatura debe ser similar a la del organismo humano (37°C) y en los que una paleta gira a unas 50 rpm para simular el movimiento de los fluidos del aparato digestivo.

Para llevar a cabo el ensayo de disolución en este dispositivo se ha de seguir el siguiente procedimiento:

- 1) Llenar el baño termostático con agua desionizada hasta la marca presente en la pared del aparato y fijar una temperatura objetivo de 37°C.
- 2) Preparar el medio de disolución a emplear y filtrar a vacío los 900 mL de cada vaso, con el fin de retirar cualquier burbuja que pueda interferir en el proceso de disolución.
- 3) Llenar los vasos vertiendo su contenido con delicadeza para evitar que se formen nuevas burbujas e ir comprobando la temperatura con un termómetro hasta que todos los vasos alcancen los 37°C objetivo.
- 4) Una vez alcanzada la temperatura deseada, introducir, en los seis primeros vasos, 6 comprimidos de la formulación a ensayar (Micardis®, X1 o X2), poner en marcha las paletas a 50 rpm y empezar a contar el tiempo.
- 5) A los tiempos preestablecidos para la toma de muestras (tabla 5), tomar 1 mL de cada uno de los vasos con formulación y reponer el mL extraído con medio del séptimo vaso, al que no se había añadido formulación.

Tabla 5. Tiempos de toma de muestras del ensayo de disolución *in vitro* en aparato de disolución tipo II: Micardis-X1-X2

Muestra	1	2	3	4	5	6	7
Tiempo (min)	5	10	15	20	30	45	60

3.3.3. Aparato de disolución tipo IV o celda de flujo.

El aparato de disolución tipo IV, también conocido como celda de flujo (figura 5), debe cumplir, al igual que el aparato tipo II, con las especificaciones recogidas en el documento para la armonización de las farmacopeas europea, estadounidense y japonesa¹⁸.

Figura 5. Aparato de disolución tipo IV.

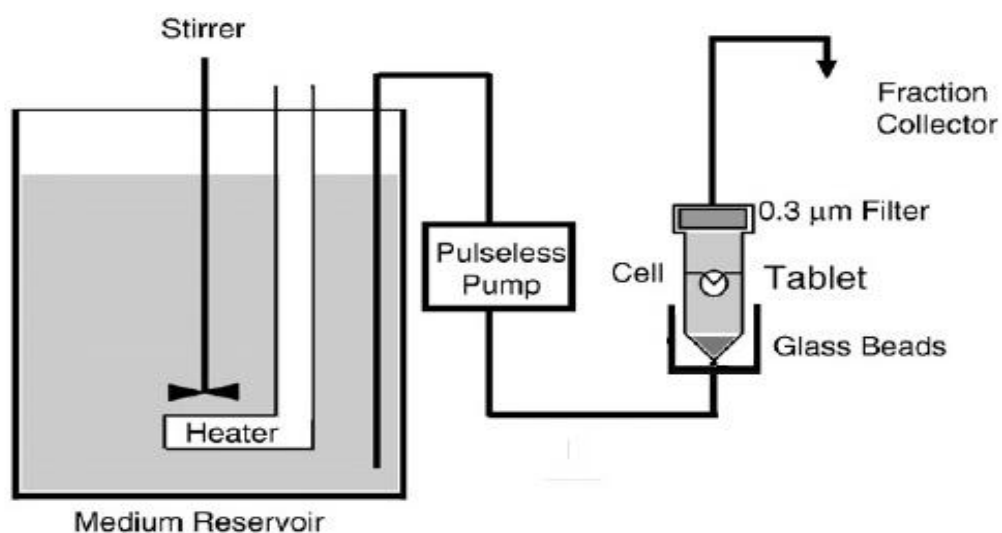
Fuente: Web de Erweka²⁰.



En este aparato, la formulación a estudiar se introduce en las celdas de flujo, cada una de las cuales se encuentra sumergida en un pequeño baño termostático a 37°C. Posteriormente, el medio de disolución, previamente atemperado, se hace pasar a través de la celda con ayuda de una bomba (figura 6) y, a los tiempos preestablecidos, se recogen muestras de la disolución para medir cuánto fármaco se ha disuelto.

Figura 6. Esquema de funcionamiento del aparato de disolución tipo IV.

Modificada de: Jinno J *et al*²¹.



En concreto, en los estudios llevados a cabo con este aparato, los medios de disolución se hicieron pasar por la celda con un flujo de 8 mL/min. Además, a lo largo del ensayo, el medio que se hacía pasar a través de la celda se fue cambiando, con el fin de imitar los cambios de pH que sufren las formulaciones al avanzar por el tracto gastrointestinal. En la tabla 6, se recogen los tiempos de toma de muestras junto con el medio presente en el aparato en cada momento.

Tabla 6. Tiempos de toma de muestras del ensayo de disolución *in vitro* en aparato de disolución tipo IV: Micardis-X1-X2

Medio		Tiempo (min)									
Farmacopea	pH 1,2	5	10	15							
	pH 4,5	20	30								
	pH 6,8	45	60	90	120						
Farmacopea + Tween 80	pH 1,2	5	10	15							
	pH 4,5	20	30								
	pH 6,8	45	60	90	120						
FaSSIF		5	10	15	20	30	45	60	90	120	

3.3.4. Cálculo de f_2 .

Una vez realizados los ensayos *in vitro* descritos previamente, se debe valorar cómo de parecidos son los perfiles de las distintas formulaciones estudiadas. Para ello, se debe calcular, por parejas (Micardis®-X1 y Micardis®-X2) el factor de similitud f_2 . La fórmula a emplear para llevar a cabo el cálculo de f_2 se muestra en la ecuación 6, donde:

- n se corresponde con el número de puntos empleados para el cálculo, el cual es limitado, ya que se utilizan puntos hasta que una (EMA¹¹) o ambas (FDA¹⁰) formulaciones alcanzan el 85% disuelto, pues más allá se alcanza una asíntota y las formulaciones parecerían más similares de lo que en realidad son.
- R_t es el porcentaje de formulación de referencia disuelto a tiempo t .
- T_t es el porcentaje de formulación test disuelto a tiempo t .

$$f_2 = 50 \cdot \log \left(\frac{1}{\sqrt{1 + \frac{1}{n} \cdot \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2}} \cdot 100 \right) \quad (6)$$

Un factor de similitud f_2 mayor o igual de 50 asegura similitud o equivalencia entre las formulaciones y que la diferencia entre los puntos de las 2 formulaciones comparadas es menor al 10%¹⁰.

Con el estudio del factor f_2 , se pretende seleccionar aquel ensayo *in vitro* (aparato y medio) que reproduzca de mejor manera los resultados *in vivo*, es decir, una vez hallado el valor de f_2 para Micardis® y X1 y para Micardis® y X2 en todos los ensayos, se elegirá, para realizar la IVVC, aquel en el que se obtenga que las formulaciones son similares o no similares del mismo modo que en el estudio de bioequivalencia *in vivo*.

3.3.5. Selección del modelo que mejor ajusta al perfil de disolución.

Cuando ya se han seleccionado los datos *in vitro* a utilizar en la IVVC, se debe buscar aquel modelo matemático que mejor ajuste al perfil de disolución, con el fin de completar dicho perfil y poder disponer de las fracciones disueltas de fármaco (f_{diss}) a cualquier tiempo.

En este trabajo, se probó a realizar el ajustado por dos modelos: un modelo más simple, de primer orden, y un modelo complejo, modelo de Weibull, cuyas ecuaciones, 7 y 8, se recogen a continuación:

$$\text{Primer orden} \quad \rightarrow \quad f_{diss_t} = f_{diss_{max}} \cdot (1 - e^{(-k_d \cdot t)}) \quad (7)$$

$$\text{Weibull} \quad \rightarrow \quad f_{diss_t} = f_{diss_{max}} \cdot \left(1 - e^{\left(-\frac{t^a}{b} \right)} \right) \quad (8)$$

El proceso de selección de un modelo u otro dependerá de los parámetros de bondad de ajuste como: el coeficiente de correlación entre datos experimentales y predichos, la suma de cuadrados residual (SSR), el coeficiente de variación de los parámetros, la representación gráfica de residuales frente al tiempo y el criterio de información de Akaike (AIC).

Si los modelos comparados tienen distinto número de parámetros, como en este caso (primer orden - k_d y Weibull - a y b), y, aparentemente, el modelo más complejo parece el mejor modelo, esta decisión se toma llevando a cabo un análisis de las varianzas en el que se comparan dos valores: la $F_{calculada}$ (F_{cal}) y la $F_{tabulada}$ (F_{tab}). La F_{tab} viene definida por la probabilidad de error que se asuma, generalmente 0,05, y los grados de libertad (GL) de cada modelo. Por su parte, la F_{cal} debe calcularse siguiendo la ecuación 9:

$$F_{cal} = \left(\frac{SC_{po} - SC_w}{SC_w} \right) \cdot \left(\frac{GL_w}{GL_{po} - GL_w} \right) \quad (9)$$

Si el valor de la F_{cal} es menor que el valor de la F_{tab} , se seleccionará el modelo más simple (primer orden) y, si sucede al contrario, se seleccionará el modelo complejo (Weibull).

3.4. Correlación *in vitro-in vivo*.

Llegados a este punto del trabajo, en el que ya se han definido los perfiles de absorción *in vivo* (f_a-t) y los perfiles de disolución *in vitro* ($f_{diss}-t$) para Micardis®, X1 y X2, es el momento de comenzar con el desarrollo de la IVIVC.

En primer lugar, debe comprobarse si el proceso de absorción y el de disolución se dan a la misma velocidad. Para ello, se representan en una misma gráfica las fracciones disueltas y absorbidas de las distintas formulaciones a lo largo del tiempo y se observa si las curvas se superponen.

- Si es así, los procesos se dan al mismo ritmo y se puede establecer de forma directa la correlación (ecuación 10), relacionando las fracciones absorbidas del ensayo *in vivo* (eje Y) con las fracciones disueltas predichas a los mismos tiempos (eje X), las cuales se calcularán sustituyendo los t_{vivos} en la ecuación del modelo *in vitro* seleccionada previamente.

$$y = a + b \cdot x \quad \rightarrow \quad f_a = a + b \cdot f_{diss} \quad (10)$$

- No obstante, lo más frecuente es que la absorción y la disolución se den a distinta velocidad y los perfiles no se superpongan, lo que hace necesario un escalado del tiempo o Levy Plot^{7,22}.

El escalado de tiempo o Levy Plot trata de “estirar” o “encoger” los tiempos de disolución *in vitro* para hacerlos coincidir con los tiempos de absorción *in vivo*, a fin de simular que ambos procesos son superponibles. Este escalado se consigue tras representar en una gráfica los t_{vivos} (eje X) frente a los t_{vitros} a los que las fracciones disueltas son iguales a las fracciones absorbidas (eje Y), hallándose estos sustituyendo las f_a en la ecuación del modelo *in vitro* seleccionada previamente. La regresión lineal de la gráfica descrita nos devuelve la relación entre los t_{vivos} y los t_{vitros} (ecuación 11).

$$y = a + b \cdot x \quad \rightarrow \quad t_{vitro} = a + b \cdot t_{vivo} \quad (11)$$

Despejando la ecuación anterior y sustituyendo en t_{vitro} los tiempos de toma de muestra de los ensayos de disolución *in vitro*, se obtienen los tiempos *in vitro* “estirados” o “encogidos” (t_{vitro}') y si, en este momento, se vuelven a representar las fracciones disueltas y absorbidas de las distintas formulaciones a lo largo del tiempo, t_{vitro}' y t_{vivo} , en una misma gráfica, se comprueba que, efectivamente, los perfiles se superponen.

En el momento que se logra que las curvas del proceso de absorción y del proceso de disolución se superpongan, ya está todo listo para establecer la IVIVC, para lo que se ha de seguir el siguiente procedimiento:

- 1) Como el objetivo de la IVIVC es establecer una relación lineal entre fracciones absorbidas (eje Y) y fracciones disueltas (eje X) a los mismos tiempos, y la escala temporal se ha alterado con el Levy Plot, en primer lugar, se deben calcular, sustituyendo en ecuación 11, los tiempos *in vitro* equivalentes ($t_{vitro-equiv}$) a los tiempos *in vivo* (t_{vivo}).
- 2) Cuando se disponga de los $t_{vitro-equiv}$, se hallará, por interpolación lineal punto a punto con los datos predichos por el modelo *in vitro* seleccionado, las f_{diss} para dichos tiempos ($f_{diss-nuevo}$).

- 3) Representar en una gráfica las fracciones absorbidas del ensayo *in vivo* (eje Y) frente a las nuevas fracciones disueltas a los tiempos equivalentes (eje X) y establecer la relación lineal entre ambas ($Y=a+bX$), tal y como se indica en la ecuación 10.

Finalmente, se debe comprobar el grado de predictibilidad de la IVIVC con el fin de establecer si ésta es capaz de establecer, con un bajo grado de error, la biodisponibilidad *in vivo* a partir de datos *in vitro*. En este trabajo, se efectuó una validación interna de la correlación obtenida, mediante el cálculo del porcentaje de error de predicción (%EP), siguiendo la fórmula de la ecuación 12, en la que se deben sustituir en “observado” las f_a reales del estudio *in vivo* y en “predicho” las fracciones absorbidas que se obtienen a partir de la IVIVC ($f_{a-nuevo}$) cuando se sustituyen en la misma las fracciones disueltas empleadas para establecer la relación.

$$\%EP = \frac{\text{Observado} - \text{Predicho}}{\text{Observado}} \cdot 100 \quad (12)$$

Una correlación se considerará válida y, por lo tanto, predictiva, si se cumplen las dos condiciones siguientes:

- El %EP medio absoluto de todas las formulaciones es inferior al 10%.
- El %EP individual de cada formulación no supera el 15%.

4. Resultados y discusión.

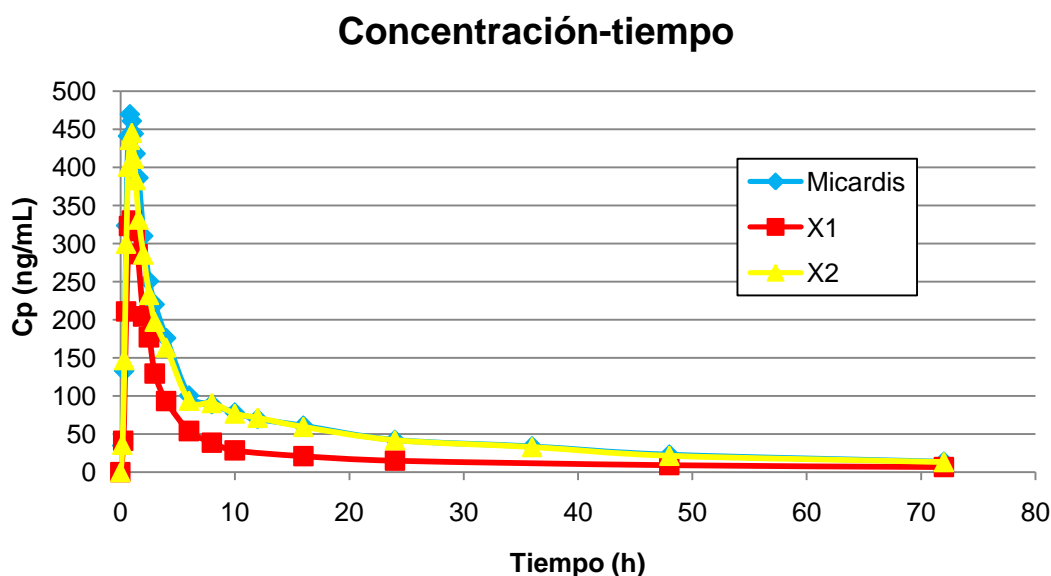
4.1. Ensayos *in vivo*.

En la tabla 7, se recogen los datos, concentración plasmática-tiempo (Cp-t), facilitados por la industria tras llevar a cabo el estudio de bioequivalencia *in vivo* de las 3 formulaciones de telmisartán (Micardis®, X1 y X2). Además, en la figura 7, se presenta una gráfica comparativa de los perfiles de las 3 formulaciones.

Tabla 7. Concentraciones plasmáticas a distintos tiempos tras la administración oral de Micardis®, X1 y X2.

Micardis®		X1		X2	
Tiempo (h)	Cp (ng/mL)	Tiempo (h)	Cp (ng/mL)	Tiempo (h)	Cp (ng/mL)
0	0,164	0	0	0	0,289
0,167	35,017	0,25	41,261	0,167	36,23
0,333	133,033	0,5	211,046	0,333	147,236
0,5	323,678	0,75	323,261	0,5	299,916
0,667	441,221	1	330,386	0,667	400,879
0,833	469,756	1,25	316,511	0,833	436,124
1	461,001	1,5	286,38	1	445,195
1,167	444,336	2	204,513	1,167	411,472
1,333	418,118	2,5	177,179	1,333	383,326
1,583	386,411	3	129,517	1,583	331,518
2	310,103	4	93,185	2	285,672
2,5	250,773	6	53,968	2,5	232,771
3	220,184	8	38,702	3	197,554
4	176,146	10	28,385	4	163,837
6	100,589	16	20,875	6	94,003
8	89,059	24	14,935	8	90,9
10	78,242	48	9,093	10	77,121
12	69,898	72	6,668	12	71,542
16	61,003			16	59,623
24	42,429			24	42,234
36	33,899			36	33,198
48	23,047			48	21,75
72	13,818			72	13,506

Figura 7. Perfiles de Cp-t del estudio *in vivo* para cada una de las 3 formulaciones estudiadas



La tabla siguiente (tabla 8) recoge los resultados finales del estudio de bioequivalencia tras analizar las diferencias entre Micardis® y X1 y Micardis® y X2, tanto desde el punto de vista de la concentración plasmática máxima (C_{max}) como del área bajo la curva (AUC).

Tabla 8. Resumen de los resultados de los análisis estadísticos de telmisartán comparando las formulaciones test (X1 y X2) con la formulación de referencia (Micardis®).

Formulación	C_{max}		AUC	
	Ratio (%)	IC ₉₀ (%)	Ratio (%)	IC ₉₀ (%)
X1	86,31	78,11 - 95,37	93,99	89,27 - 98,97
X2	93,80	82,77 - 106,33	93,50	89,30 - 97,94

La EMA y la FDA, consideran que 2 formulaciones son bioequivalentes si, tras realizar el análisis estadístico de un estudio comparativo en humanos, los valores de su intervalo de confianza al 90% (IC_{90%}), tanto de C_{max} como de AUC, se encuentra comprendidos entre 80% y 125%^{11,23}. Por ello, de acuerdo con los datos recogidos en la tabla 8, puede decirse que en el estudio *in vivo*:

- X1 no es bioequivalente a Micardis®, ya que el límite inferior del IC_{90%} de C_{max} es inferior al 85%
- X2 sí que es bioequivalente, pues los IC_{90%} de C_{max} y AUC se encuentran entre el 80 y el 125%.

Lo anterior, hace necesario que, para llevar a cabo la IVIVC, se deba buscar un ensayo *in vitro* capaz de discriminar entre las 2 formulaciones e indicar, al igual que en *in vivo*, que X1 no es bioequivalente y X2 sí lo es.

4.1.1. Estudio de perfusión intravenosa.

Los valores de las microconstantes (k_{12} , k_{21} y k_{13}), que caracterizan el modelo bicompartimental y son necesarias para calcular las fracciones absorbidas durante el estudio de bioequivalencia por el método matemático de Loo-Riegelman, se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Resumen de las microconstantes del modelo bicompartimental, estimadas con el programa Winnonlin V.7 tras efectuar un estudio de perfusión intravenosa de telmisartán.

	Parámetro	Desviación estándar (DE)	Coefficiente de variación (CV)
k_{13}	4,110	0,425	10,342
k_{12}	3,337	0,635	19,020
k_{21}	2,271	0,701	30,862

4.1.2. Perfil de absorción (Wagner-Nelson o Loo-Riegelman).

En la tabla 10, se recogen los perfiles de absorción (fracciones absorbidas frente al tiempo), tras realizar el estudio de los datos por el método Wagner-Nelson, para Micardis®, X1 y X2.

Tabla 10. Fracciones absorbidas frente al tiempo, obtenidas por el método de Wagner-Nelson tras asumir que el telmisartán se comporta como un fármaco monocompartmental.

Micardis®		X1		X2	
Tiempo (h)	f_a (%)	Tiempo (h)	f_a (%)	Tiempo (h)	f_a (%)
0	0,00	0	0,00	0	0,00
0,167	0,35	0,25	0,49	0,167	0,36
0,333	1,55	0,5	2,89	0,333	1,70
0,5	4,30	0,75	6,11	0,5	4,16
0,667	7,48	1	8,88	0,667	7,01
0,833	10,33	1,25	11,19	0,833	9,67
1	12,78	1,5	13,01	1	12,12
1,167	14,92	2	15,35	1,167	14,03
1,333	16,73	2,5	17,23	1,333	15,65

1,583	19,13	3	18,47	1,583	17,56
2	22,08	4	20,72	2	20,28
2,5	24,77	6	24,07	2,5	22,83
3	27,14	8	26,00	3	24,93
4	31,70	10	27,41	4	29,16
6	38,06	16	31,78	6	35,11
8	42,53	24	35,31	8	39,68
10	46,46	48	43,57	10	43,56
12	49,97	72	47,73	12	47,16
16	57,57			16	54,66
24	68,88			24	65,86
36	81,09			36	77,86
48	88,32			48	84,71
72	100,00			72	95,99

Por su parte, la tabla 11 muestra los perfiles de absorción, pero tras tratar los datos con el modelo matemático de Loo-Riegelman.

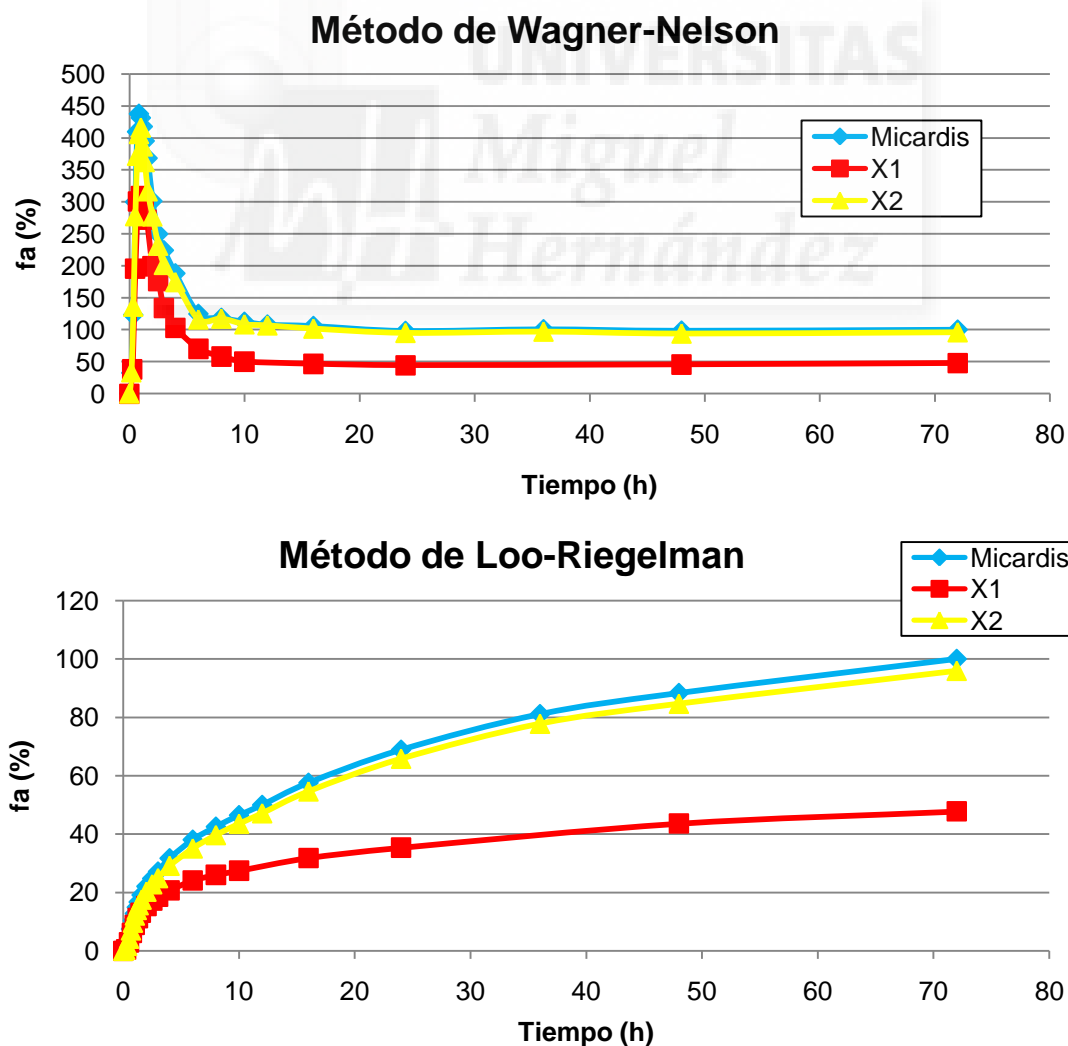
Tabla 11. Fracciones absorbidas frente al tiempo, obtenidas por el método de Loo-Riegelman tras asumir que el telmisartán se comporta como un fármaco bicompartimental.

Micardis®		X1		X2	
Tiempo (h)	f _a (%)	Tiempo (h)	f _a (%)	Tiempo (h)	f _a (%)
0	0,00	0	0,00	0	0,01
0,167	1,10	0,25	1,45	0,167	1,14
0,333	4,70	0,5	8,37	0,333	5,16
0,5	12,70	0,75	17,06	0,5	12,19
0,667	21,27	1	24,44	0,667	19,87
0,833	28,69	1,25	31,02	0,833	26,90
1	35,29	1,5	36,50	1	33,56
1,167	41,37	2	43,83	1,167	38,88
1,333	46,72	2,5	49,51	1,333	43,70
1,583	54,07	3	52,66	1,583	49,62
2	63,19	4	56,06	2	58,12
2,5	71,14	6	56,49	2,5	65,54
3	77,27	8	53,77	3	70,94
4	85,63	10	50,37	4	78,67
6	90,18	16	43,93	6	83,16

8	89,64	24	41,03	8	83,75
10	88,58	48	45,67	10	83,60
12	87,33	72	47,77	12	83,16
16	86,10			16	82,59
24	85,58			24	82,46
36	90,37			36	87,16
48	92,15			48	88,36
72	100,00			72	96,14

Finalmente, la figura 8 presenta de forma gráfica los valores de las tablas 10 y 11, a fin de poder realizar una comparación rápida y sencilla de los perfiles de absorción obtenidos por cada uno de los métodos y, así, poder seleccionar aquel que representa de mejor manera el proceso de absorción.

Figura 8. Perfiles de absorción *in vivo* (f_a-t) por Wagner-Nelson y por Loo-Riegelman.



Las gráficas anteriores permiten observar de forma clara como sólo usando el método de Loo-Riegelman se consigue que las fracciones absorbidas aumenten gradualmente con el tiempo hasta alcanzar un máximo. Por ello, el modelo bicompartimental extravasal es el que mejor se ajusta a los datos experimentales y, por lo tanto, las fracciones absorbidas calculadas por el método de Loo-Riegelman serán las que se utilizarán para comparar con el perfil de disolución *in vitro* en la IVIVC.

4.2. Ensayos *in vitro*.

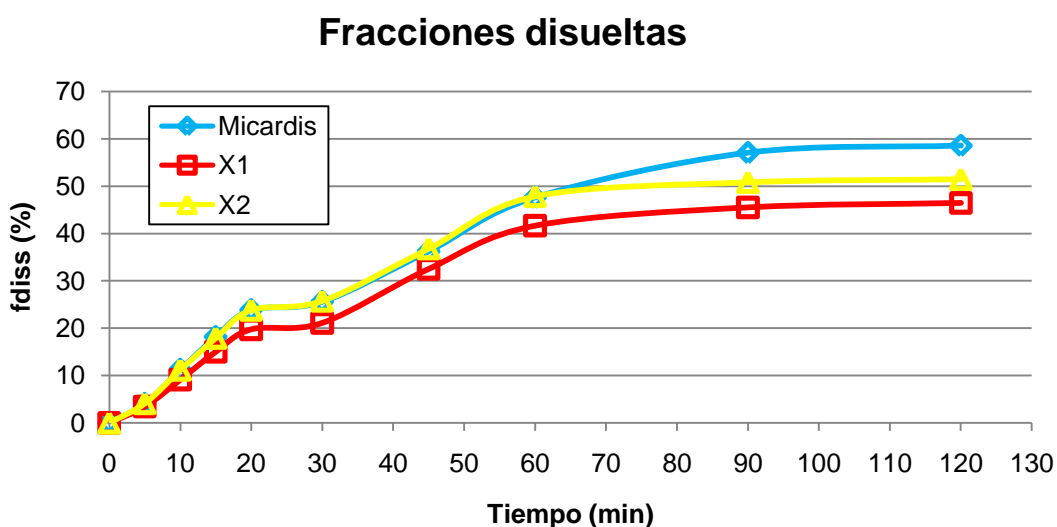
4.2.1. Cálculo de f_2 .

De todos los ensayos *in vitro* llevados a cabo, el único que resultó ser biopredictivo y permitió obtener resultados similares al ensayo *in vivo* fue el ensayo de disolución llevado a cabo en el aparato de disolución tipo IV con los medios de referencia con Tween 80 al 0,05%. La tabla 12 recoge los valores de las fracciones disueltas frente al tiempo para este ensayo y en la figura 9 se muestran dichos perfiles en forma de gráfica.

Tabla 12. Resultados del ensayo de disolución, seleccionado para desarrollar la IVIVC, llevado a cabo con el aparato de disolución tipo IV, junto con los medios empleados en el mismo.

Medio de disolución	Tiempo (min)	Fracciones disueltas - f_{diss} (%)		
		Micardis®	X1	X2
pH 1,2 + Tween 80 0,05%	0	0,00	0,00	0,00
	5	4,04	3,43	4,12
	10	11,24	9,13	11,18
	15	18,18	15,03	17,92
pH 4,5 + Tween 80 0,05%	20	23,85	19,77	23,84
	30	25,58	21,12	25,76
pH 6,8 + Tween 80 0,05%	45	36,26	32,53	36,81
	60	47,62	41,66	47,86
	90	57,07	45,53	50,83
	120	58,58	46,47	51,49

Figura 9. Perfiles de disolución in vitro ($f_{\text{diss}}-t$) obtenidos en el aparato de disolución tipo IV con los medios indicados por la farmacopea modificados con Tween 80 (0,05%).



La elección de este estudio como el idóneo para llevar a cabo la IVIVC se efectuó tras calcular el factor de similitud f_2 para los resultados de todos los ensayos *in vitro* llevados a cabo y comprobar que éste era el único que daba unos valores coherentes con los resultados in vivo (X1 no-bioequivalente y X2 bioequivalente). En este trabajo, el factor de similitud f_2 se determinó de 3 formas distintas:

- En primer lugar, se muestran, en la tabla 14, los f_2 que se obtienen al comparar Micardis® y X1 y Micardis® y X2 usando directamente los valores de f_{diss} obtenidos al realizar el ensayo. En este caso, como ningún perfil alcanza el 85% se utilizan todos los datos para hallar f_2 y su resultado es el mismo tanto si se siguen los criterios de la EMA como los de la FDA.
- No obstante, puesto que, aunque ningún perfil alcanza el 100%, en la figura 9 se puede observar que sí que se llega a una asíntota, se pueden recalculan las f_{diss} , tomando el valor más alto como el 100% (tabla 13). Una vez hecho esto, se puede calcular f_2 según:
 - Los criterios de la EMA.- Cogiendo no más de un valor de $f_{\text{diss}} > 85\%$ para cualquiera de las formulaciones.
 - Los criterios de la FDA.- Considerando sólo una medición más después de que las f_{diss} de ambos productos sean $> 85\%$.

Tabla 13. Fracciones disueltas recalculadas a partir de los resultados tomando el valor más alto de la tabla 12 como 100%.

Medio de disolución	Tiempo (min)	Fracciones disueltas - f_{diss} (%)		
		Micardis®	X1	X2
pH 1,2 + Tween 80 0,05%	5	6,90	5,86	7,03
	10	19,19	15,59	19,09
	15	31,03	25,66	30,59
pH 4,5 + Tween 80 0,05%	20	40,71	33,75	40,70
	30	43,67	36,05	43,97
pH 6,8 + Tween 80 0,05%	45	61,90	55,53	62,84
	60	81,29	71,12	81,70
	90	97,42	77,72	86,77
	120	100,00	79,33	87,90

La tabla 14 recoge todos los valores de f_2 calculados según los métodos indicados previamente.

Tabla 14. Valores del factor de similitud f_2 para cada formulación comparada con la referencia.

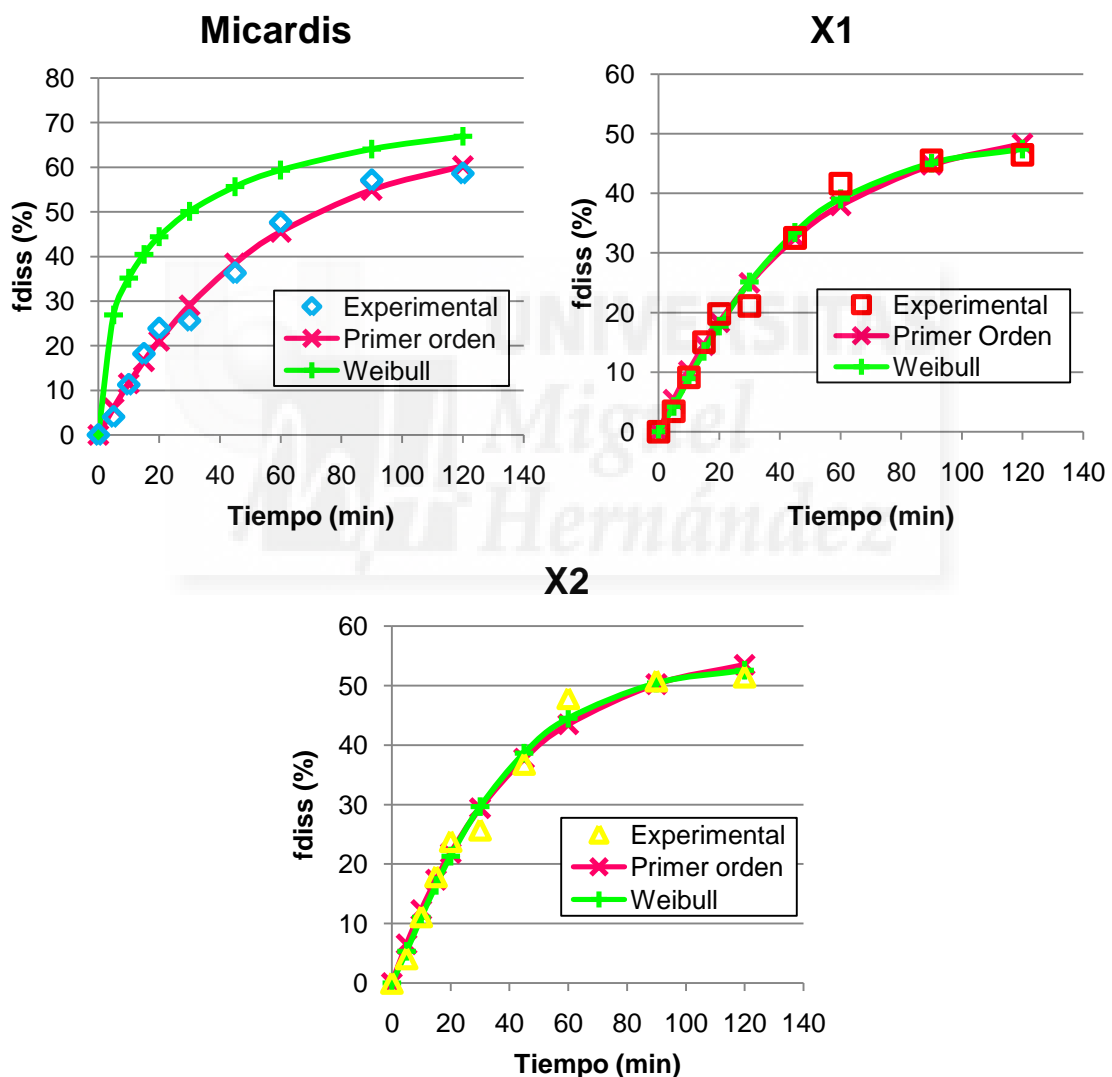
Método	Micardis® - X1		Micardis® - X2	
	n	f_2	n	f_2
Directo (EMA y FDA)	9	59,09	9	70,00
Recalculado + EMA	8	51,61	8	70,34
Recalculado + FDA	9	47,65	8	70,34

Los datos de la tabla anterior, muestran que los resultados obtenidos con este ensayo concuerdan bastante bien con los resultados del estudio *in vivo*, ya que, en todos los casos, X2 se parece a Micardis® más que X1. No obstante, sólo, en el caso de que se recalculen las f_{diss} y se asuman los criterios de cálculo de f_2 de la FDA, se obtiene que X1 no es similar a Micardis® ($f_2 < 50$), es decir, que X1 no es bioequivalente, tal y como salía en el estudio de bioequivalencia en humanos. Este hecho, pone de manifiesto la problemática de comparar perfiles de disolución que no llegan a 100%, pero sí que alcanzan valores asintóticos, puesto que si se toman todos los puntos del perfil, se sesga el valor f_2 , porque las diferencias alrededor de la asíntota son muy pequeñas y las formulaciones parecen más similares de lo que en realidad son.

4.2.2. Selección del modelo que mejor ajusta al perfil de disolución.

La figura 10 muestra 3 gráficas, una para cada formulación estudiada en el ensayo de disolución seleccionado, en las que se puede apreciar los valores experimentales de la f_{diss} obtenidos durante el desarrollo del estudio y los dos ajustados, primer orden y Weibull, que fueron probados con el fin de completar los perfiles de disolución.

Figura 10. Gráficas f_{diss} -t para cada una de las 3 formulaciones con los ajustes al modelo de primer orden y al modelo lineal.



A simple vista, puede concluirse que el mejor ajustado es el del modelo de primer orden, ya que es el que más se parece a los valores reales en las 3 formulaciones. Además, al efectuar la comparación de F_{cal} y F_{tab} , esta conclusión se confirma, ya que F_{cal} (-6,73) es menor que F_{tab} (5,59) y, por lo

tanto, interesa quedarse con el modelo más simple (primer orden). En las ecuaciones 13, 14 y 15 se muestra la ecuación del modelo de primer orden para cada una de las formulaciones estudiadas y, en la tabla 15, se recogen los valores de las fracciones disueltas frente al tiempo, predichas haciendo uso de dichas ecuaciones.

$$\text{Micardis} \rightarrow f_{diss_t} = 67,32 \cdot (1 - e^{(-0,019 \cdot t)}) \quad (13)$$

$$\text{X1} \rightarrow f_{diss_t} = 52,21 \cdot (1 - e^{(-0,022 \cdot t)}) \quad (14)$$

$$\text{X2} \rightarrow f_{diss_t} = 56,47 \cdot (1 - e^{(-0,024 \cdot t)}) \quad (15)$$

Tabla 15. Fracciones disueltas predichas mediante el modelo de primer orden.

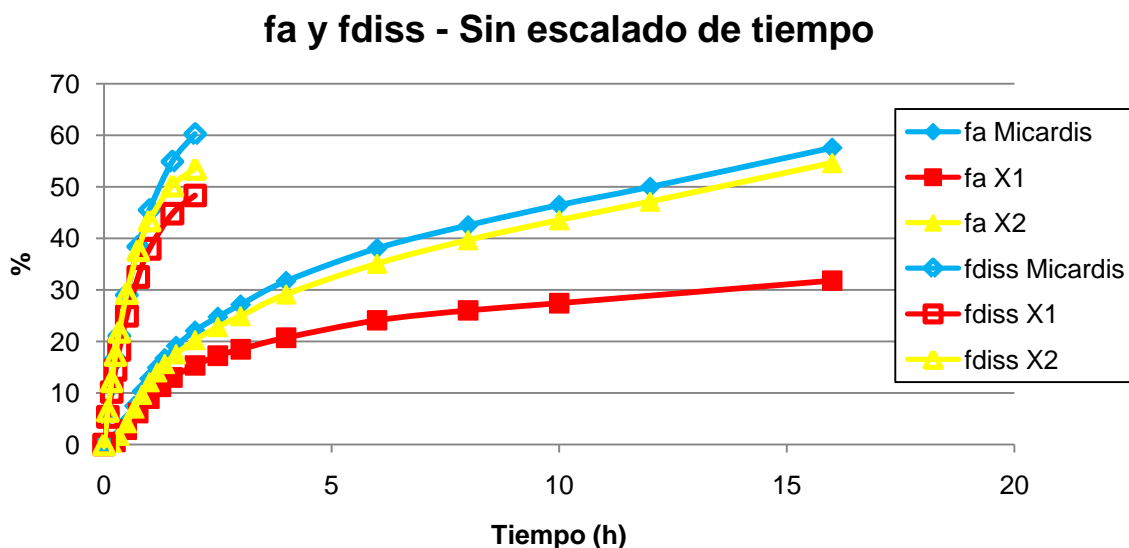
Tiempo (min)	Primer orden - $f_{diss-pred}$ (%)		
	Micardis®	X1	X2
0	0,00	0,00	0,00
5	6,04	5,36	6,50
10	11,53	10,17	12,26
15	16,54	14,49	17,35
20	21,09	18,36	21,86
30	29,01	24,96	29,37
45	38,42	32,52	37,70
60	45,52	37,99	43,47
90	54,91	44,78	50,23
120	60,26	48,33	53,47

4.3. Correlación *in vitro-in vivo*.

4.3.1. Escalado de tiempo o Levy Plot.

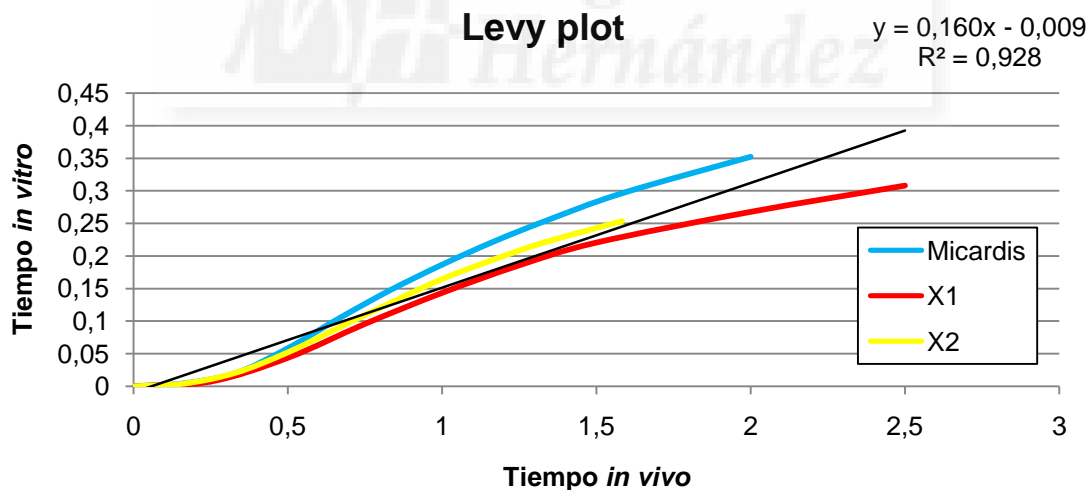
La figura 11 muestra todos los perfiles de absorción y disolución en una misma gráfica, aunque el perfil de absorción no está completo (se representa hasta el tiempo 16h), y puede observarse que ambos procesos, la absorción *in vivo* y la disolución *in vitro*, se dan a distinto ritmo. En concreto, la absorción es más lenta que la disolución. Esto hace necesario que, antes de comenzar el desarrollo de la IVVC, se realice un ajustado de tiempo que permita hacer superponibles los perfiles de absorción y disolución.

Figura 11. Representación de los procesos de absorción y disolución a escala temporal real.



En la figura 12, se muestra la gráfica del Levy Plot, en la que se representan los tiempos *in vivo* y los tiempos *in vitro* a los que las f_{diss} serán iguales a las f_a , y a partir de la cual se obtiene la ecuación para escalar el tiempo (ecuación 16).

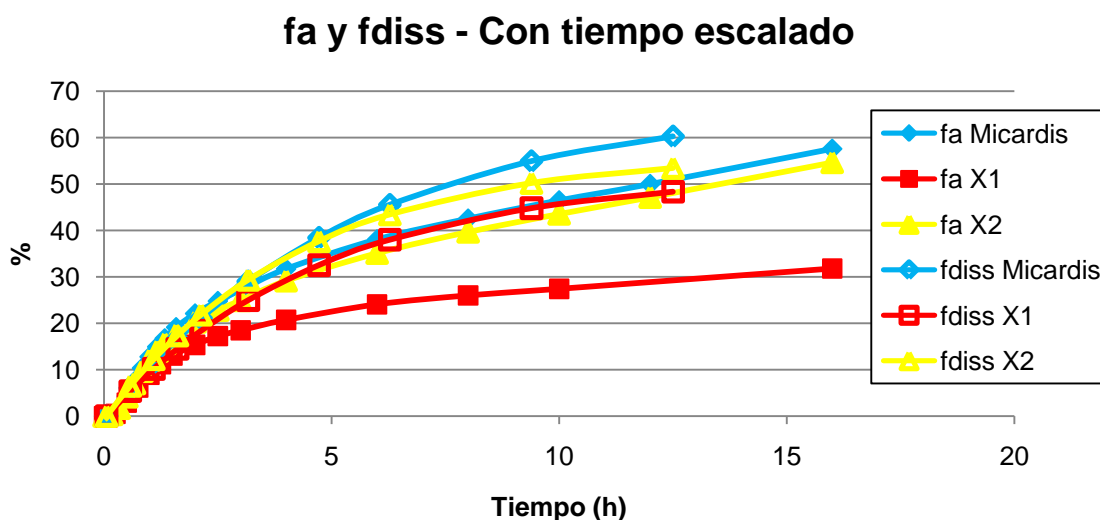
Figura 12. Escalado del tiempo o Levy Plot.



$$y = a + b \cdot x \rightarrow t_{vitro} = -0,009 + 0,160 \cdot t_{vivo} \quad (16)$$

Una vez escalado el tiempo, los procesos de absorción y disolución sí que se superponen, tal y como se muestra en la figura 13.

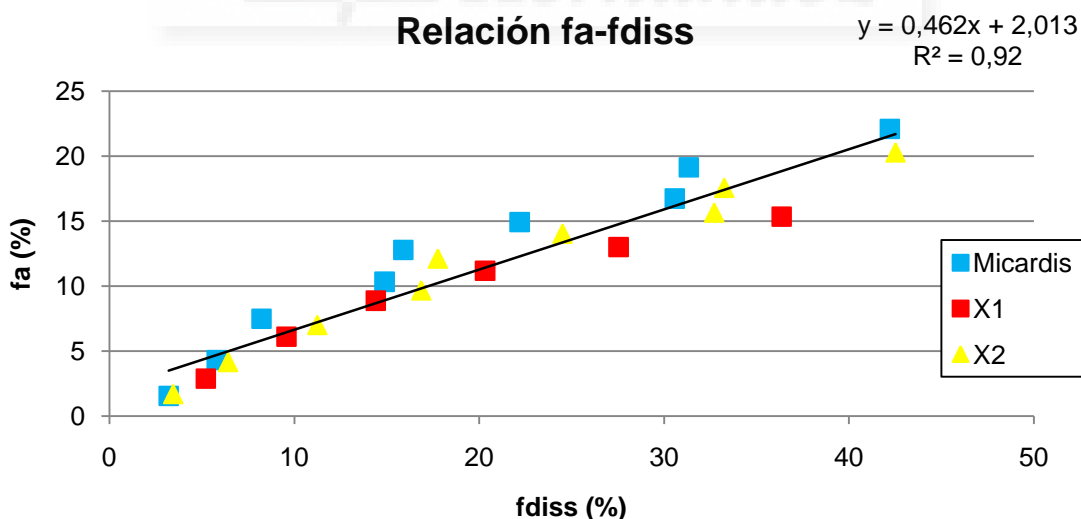
Figura 13. Representación de los procesos de absorción y disolución con el tiempo escalado.



4.3.2. Recta correlación.

Cuando se dispone de la ecuación para el escalado de tiempo, se puede representar en una gráfica las f_a frente a las f_{diss} a tiempos equivalentes. La figura 14 muestra dicha gráfica, a partir de la cual se obtiene la ecuación de la IVIVC (ecuación 17).

Figura 14. Correlación *in vitro-in vivo* (IVIVC).



$$y = a + b \cdot x \quad \rightarrow \quad f_a = 2,013 + 0,462 \cdot f_{diss} \quad (17)$$

Con la presente ecuación, se podrían predecir las f_a a partir de estudios *in vitro*. Aunque, hay que valorar cómo de correctas serían dichas predicciones.

4.3.3. Grado de predictibilidad.

El estudio del grado de predictibilidad de la IVIVC se realizó mediante valoración interna calculando el error de predicción (%EP).

La tabla 16 muestra las f_a reales del estudio *in vivo* (f_a) y las fracciones absorbidas que se obtienen sustituyendo en la ecuación de la IVIVC las f_{diss} empleadas para el desarrollo de la misma ($f_{a-nuevo}$).

Tabla 16. Conjunto de fracciones absorbidas reales (estudio *in vivo*) y fracciones absorbidas predichas por la IVIVC necesarias para el cálculo del %EP.

Micardis®		X1		X2	
f_a (%)	$f_{a-nuevo}$ (%)	f_a (%)	$f_{a-nuevo}$ (%)	f_a (%)	$f_{a-nuevo}$ (%)
1,55	3,50	2,89	4,43	1,70	3,61
4,30	4,70	6,11	6,45	4,16	4,99
7,48	5,82	8,88	8,69	7,01	7,22
10,33	8,90	11,19	11,42	9,67	9,82
12,78	9,37	13,01	14,76	12,12	10,24
14,92	12,29	15,35	18,84	14,03	13,36
16,73	16,17			15,65	17,16
19,13	16,52			17,56	17,41
22,08	21,56			20,28	21,70

A partir de los valores anteriores, sustituyendo en la ecuación del %EP (ecuación 12), se obtienen los %EP recogidos en la tabla 17.

Tabla 17. Resumen de los % de error de predicción individuales y promedio.

	Micardis®	X1	X2	Total
%EP	26,01	16,60	6,55	21,16

Estos %EP permiten concluir que la correlación obtenida en este trabajo no podría emplearse para predecir la biodisponibilidad con fines regulatorios, ya que los %EP son superiores a los permitidos:

- El % de error de predicción medio absoluto de todas las formulaciones (21,16%) es superior al 10%.
- El % de error de predicción individual tanto para Micardis® (26,01%) como para la formulación X1 (16,60%) son superiores al 15%.

5. Conclusiones y expectativas de futuro.

De todo lo dicho previamente, pueden extraerse tres conclusiones clave que se indican a continuación:

- 1) El telmisartán es un fármaco con un comportamiento farmacocinético *in vivo* definido, que actúa distribuyéndose por el organismo en dos fases, lo que lo hace ajustable a un modelo bicompartimental.
- 2) El modelo de disolución *in vitro* que emplea el aparato de disolución tipo IV y los medios indicados por la Farmacopea Europea modificados con Tween 80 (0,05%) resulta ser biopredictivo para el estudio del comportamiento de las distintas formulaciones de telmisartán, ya que permite obtener, mediante el cálculo del factor de similitud f_2 , las mismas conclusiones que con los ensayos *in vivo*.
- 3) Los estudios realizados durante este trabajo han permitido desarrollar una IVIVC nivel A que, si bien no podría emplearse como sustituta de los ensayos de bioequivalencia *in vivo* pues el %EP es superior al permitido, sí resultaría útil para la industria, como primer filtro, para decidir, de entre varias formulaciones o lotes, cuáles deben pasar a la fase de estudio de bioequivalencia en humanos.

En el futuro, cabría esperar que se siguiese estudiando este tema a fin de encontrar un modelo *in vitro* más preciso que el que aquí se presenta, para poder disminuir del %EP de la IVIVC y, así, poder emplear los ensayos *in vitro* como sustitutos de los estudios de bioequivalencia en humanos.

5. Conclusions and future expectations.

From all of the above, three key conclusions can be drawn, which are listed below:

- 1) Telmisartan is a drug with a defined *in vivo* pharmacokinetic behaviour, it is distributed through an organism in two phases, which makes it adjustable to a bicompartamental model.
- 2) The *in vitro* dissolution model which employs the type IV dissolution apparatus and the environment indicated by the European Pharmacopeia modified with Tween 80 (0.05%) is bio-predictive for the study of the behaviour of the different telmisartan formulations, since it allows, by the calculation of the f_2 similarity factor, the same conclusions as the *in vivo* tests.
- 3) The studies carried out during this investigation have allowed the development of a level A IVIVC which, although it could not be used as a substitute of *in vivo* bioequivalence tests because the %EP is higher than the permitted, would be useful for the industry as a first filter to decide, among several formulations or batches, which should go to the bioequivalence study phase in humans.

In the future, this subject should be continued studied in order to find a more precise *in vitro* model than the one presented here, with the aim of being able to decrease the IVIVC %EP and, thus, can use *in vitro* tests as substitutes of bioequivalence studies in humans.

6. Referencias.

- ¹ Real Academia Española (RAE). Diccionario de la lengua española [sede web]. Madrid, España: RAE; [14 abril 2017]. Disponible en: <http://dle.rae.es/?id=Ay3JMEx>
- ² U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration: Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation, and Application of *In Vitro/In Vivo* Correlations. [monografía en internet]. Silver Spring, Maryland, USA: FDA; 1997 [14 abril 2017]. Disponible en: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070239.pdf>
- ³ The United States Pharmacopeia. *In vitro* and *in vivo* evaluation of dosage forms. 39th edition. U.S. Pharmacopeial Convention, 2016.
- ⁴ Jirage A, Shaikh K, Vaishali K, Payghan SA, Patweka S. *In vitro-in vivo* Correlation for Poly (3-Hydroxybutyrate) Base Ibuprofen Extended Release Tablets. Asian J Pharm. 2017;11(1):18-26. DOI: <http://dx.doi.org/10.22377/ajp.v11i01.1039>
- ⁵ Andhariya, JV, Shen J, Choi S, Wang Y, Zou Y, Burgess DJ. Development of *in vitro-in vivo* correlation of parenteral naltrexone loaded polymeric microspheres. J Control Release. 2017;255:27-35. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.396>
- ⁶ Mittapalli RK, Nuthalapati S, Delke DeBord AE, Xiong H. Development of a Level A *in Vitro-in Vivo* Correlation for Veliparib (ABT-888) Extended Release Tablet Formulation. Pharm Res [revista en internet]. 2017. DOI: <http://doi.org/10.1007/s11095-017-2133-3>
- ⁷ Modi NB. *In Vitro-In Vivo* Correlation. En: Chilukuri DM, Gangadhar S, Young D. Pharmaceutical Product Development. *In Vitro-In Vivo* Correlation. Nueva York: Informa Healthcare USA; 2007. p. 107-23.
- ⁸ González-García I, Mangas-Sanjuán V, Merino-Sanjuán M, Bermejo M. Correlaciones *in vitro-in vivo*: conceptos generales, metodologías y su aplicación en las guías regulatorias. En: González-García I, Cabrera-Perez MA, Bermejo M. Metodologías biofarmacéuticas en el desarrollo de medicamentos. Elche: Universidad Miguel Hernández de Elche; 2015. p. 181-203.
- ⁹ Amidon GL, Lennernas 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. Pharm Res. 1995;12(3):413-20. DOI: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1016212804288>
- ¹⁰ U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration: Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guía para la industria: Exención de los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia *in vivo* para formas posológicas orales sólidas de liberación inmediata en base a un sistema de clasificación de biofarmacéuticas. [monografía en internet]. Rockville, Maryland, USA: FDA; 2000 [16 abril 2017]. Disponible en: https://www.fda.gov/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm201453.htm#P129_7501
- ¹¹ European Medicines Agency. Guideline on the investigation of bioequivalence. London, UK: EMA; 2010 [16 abril 2017]. Disponible en:

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf

¹² Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Bot Plus 2.0. Madrid, España; 2013 [16 abril 2017]. Disponible en: <https://botplusweb.portalfarma.com/>

¹³ BCS Database Search. [16 abril 2017]. Disponible en: <http://www.tsrlinc.net/search.cfm>

¹⁴ Doménech Berrozpe J, Diez Martín I, Peraire Guitart C. Administración extravasal: aproximación compartimental. En: Doménech Berrozpe J, Martínez Lanao J, Peraire Guitart C. Tratado General de Biofarmacia y Farmacocinética. Volumen I. LADME. Análisis Farmacocinético. Biodisponibilidad y bioequivalencia. Madrid, España: Editorial Síntesis; 2013. p. 297-366.

¹⁵ Stangier J, Su CA, Roth W. Pharmacokinetics of orally and intravenously administered telmisartan in healthy young and elderly volunteers and in hypertensive patients. J Int Med Res. 2000;28(4):149-67. DOI: [10.1177/147323000002800401](https://doi.org/10.1177/147323000002800401)

¹⁶ Peris Ribera JE, Torres Molina F. Administración por infusión intravenosa continua: aproximación compartimental. En: Doménech Berrozpe J, Martínez Lanao J, Peraire Guitart C. Tratado General de Biofarmacia y Farmacocinética. Volumen I. LADME. Análisis Farmacocinético. Biodisponibilidad y bioequivalencia. Madrid, España: Editorial Síntesis; 2013. p. 367-88.

¹⁷ European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care of the Council of Europe. European Pharmacopeia 9.0. 9th edition. 2016.

¹⁸ The United States Pharmacopeia. Dissolution. 39th edition. U.S. Pharmacopeial Convention, 2016.

¹⁹ Direct Industry. PharmaTest [sede web]. España; 2017 [20 abril 2017]. Disponible en: www.directindustry.es/prod/pharma-test-apparatebau/product-35060-1678981.html

²⁰ Erweka [sede web]. Alemania; 2017 [20 abril 2017]. Disponible en: <http://www.erweka.com/products/dissolution-testers/flow-through-cell-usp-4.html>

²¹ Jinno J, Kamada N, Miyake M, Yamada K, Mukai T, Odomi M, et al. *In vitro-in vivo* correlation for wet-milled tablet of poorly water-soluble cilostazol. J Control Release. 2008;130(1):29-37. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.05.013>

²² Cardot JM, Davit BM. *In vitro-In Vivo* Correlations: Tricks and Traps. AAPS J. 2012;14(3):491-9. DOI: [10.1208/s12248-012-9359-0](https://doi.org/10.1208/s12248-012-9359-0)

²³ U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration: Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry Bioavailability and Bioequivalence Studies Submitted in NDAs or INDs - General Considerations [monografía en internet]. Rockville, Maryland, USA: FDA; 2014 [24 abril 2017]. Disponible en: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm389370.pdf>