

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL FARMACIE**

***Intercomparabilitatea datelor furnizate de dispozitivele
compendiale de testare ivr pentru semisolide topice***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. ADRIAN ANDRIEȘ**

**Student-doctorand:
CIOLAN DRAGOȘ-FLORIAN**

2018

CUPRINS

INTRODUCERE	9
CAPITOLUL 1. PARTICULARITĂȚILE CĂII DE ADMINISTRARE PERCUTANEE ȘI ALE FORMELOR FARMACEUTICE SEMISOLIDE TOPICE	14
1.1. Structura pielii	14
1.1.1. Epidermul	15
1.1.2. Dermul	17
1.1.3. Structuri asociate sau anexe ale pielii	18
1.2. Transportul / penetrarea substanțelor prin piele	19
1.3. Influența proprietăților fizico-chimice ale compușilor	23
CAPITOLUL 2. CONSIDERAȚIILE TEORETICE PRIVIND TRANSPORTUL PRIN MEMBRANE/ PIELE ȘI IMPOERANȚA METODOLOGIILOR IN VITRO	26
2.1. Legile difuziei	26
2.2. Reologia	28
2.3. Generalități cu referire la folosirea metodologiilor in-vitro	31
2.4. Rolul testelor de cedare in-vitro	32
2.5. Limitele trasate de SUPAC-SS în legătură cu folosirea testelor de cedare in vitro	34
CAPITOLUL 3. ANALIZA INTERCOMPARABILITĂȚII DATELOR DE CEDARE <i>IN VITRO</i> GENERATE DE CELULELE VERTICALE DE DIFUZIE ȘI DE IMERSIE ÎN TESTAREA CONSISTENȚEI INTER-ȘARJĂ	37
3.1. Introducere	37
3.2. Materiale și metode	38
3.2.1. Descrierea produselor semisolide analizate	38
3.2.2. Protocolul de evaluare a profilelor de cedare <i>in vitro</i>	39
3.3. Rezultate	41
3.3.1. Determinarea cantitativă a testosteronului în mediu receptor hidro-alcoolic	41
3.3.2. Evaluarea profilelor de cedare <i>in vitro</i> a testosteronului	42
3.3.2.1. Rezultatul testelor de cedare in vitro efectuate în cadrul celulelor verticale de difuzie statice	43

3.3.2.1.1. Dispozitiv experimental: Celulă verticală de difuzie (VDC), 7 mL	43
3.3.2.1.2. Dispozitiv experimental: Celulă verticală de difuzie (VDC), 12 mL	49
3.3.2.2. Rezultatul testelor de cedare <i>in vitro</i> efectuate în cadrul celulelor de imersie de tip Enhancer cells	55
3.3.2.2.1. Dispozitiv experimental: Celulă Enhancer (EC), 0.5 cm ²	55
3.3.2.2.2. Dispozitiv experimental: Celulă Enhancer (EC), 2.0 cm ²	61
3.3.2.2.3. Dispozitiv experimental: Celulă Enhancer (EC), 4.0 cm ²	67
3.3.2.3. Rezultatul testelor de cedare <i>in vitro</i> efectuate în cadrul celulelor de imersie de tip Ointment	73
3.4. Discuții	79
3.5. Concluzii	84
CAPITOLUL 4. EVALUAREA PROPRIETĂȚILOR REOLOGIE ȘI CONFIRMAREA SIMILARITĂȚII MICROSTRUCTURALE INTER-ȘARJĂ	85
4.1. Introducere	85
4.2. Materiale și metode	87
4.3. Rezultate	88
4.3.1. Rezultatul testelor oscilatorii efectuate prin controlul tensiunii de forfecare	88
4.3.2. Rezultatul testelor oscilatorii efectuate prin variația frecvenței	94
4.3.3. Rezultatul testelor rotaționale de tixotropie	98
4.3.4. Rezultatul testelor rotaționale de tip curbe de fluaj (<i>creep and recovery</i>)	104
4.4. Discuții	108
4.5. Concluzii	111
CAPITOLUL 5. ADAPTAREA PROTOCOLULUI DE EVALUARE A VITEZEI DE CEDARE <i>IN VITRO</i> LA CARACTERISTICILE FORMELOR FARMACEUTICE SEMISOLIDE DE TIP CREMĂ	112
5.1. Introducere	112
5.2. Materiale și metode	114
5.3. Rezultate	116
5.3.1. Selecția mediului receptor	116
5.3.1.1. Mediu hidro-alcoolic	116
5.3.1.2. Mediu acid (acid clorhidric 0.1N)	120

5.3.2. Extrapolarea protocolului experimental optim la particularitățile celulelor de imersie	124
5.3.2.1. Celulele de imersie de tip <i>Ointment cells</i>	124
5.3.2.2. Celulele de imersie de tip <i>Enhancer cells</i>	128
5.3.2.2.1. Celulele cu suprafața expusă de 0.5 cm ²	128
5.3.2.2.2. Celulele cu suprafața expusă de 2.0 cm ²	132
5.3.2.2.3. Celulele cu suprafața expusă de 4.0 cm ²	136
5.3.3. Extrapolarea protocolului experimental optim la particularitățile celulelor în flux continuu (adaptări ale aparatului compendial 4)	140
5.4. Discuții	144
5.5. Concluzii	149
CAPITOLUL 6. STUDIUL INTERCOMPARABILITĂȚII DATELOR DE CEDARE IN VITRO PRIN ANALIZA PRODUSELOR SEMISOLIDE TOPICE MULTISURSĂ	150
6.1. Introducere	150
6.2. Materiale și metode	151
6.2.1. Descrierea produselor analizate	151
6.2.2. Scurtă prezentare a protocolului experimental utilizat pentru analiza profilelor de cedare in vitro	151
6.2.3. Analiza cantitativă a ketoconazolului printr-o metodă cromatografică	152
6.2.4. Evaluarea comparativă a comportamentului reologic	152
6.3. Rezultate	153
6.3.1. Determinarea cantitativă a ketoconazolului în probele prelevate în cadrul studiilor de cedare in vitro	153
6.3.2. Evaluarea vitezei de cedare in vitro pentru produsele multisursă	154
6.3.2.1. Analiza produselor referință	154
6.3.2.2. Analiza produselor generice	162
6.3.3. Rezultatul testelor oscilatorii efectuate prin controlul tensiunii de forfecare	166
6.3.3.1. Analiza produselor referință	166
6.3.3.2. Analiza seriilor de produse generice	171
6.3.4. Rezultatul testelor rotaționale de tixotropie	174
6.3.4.1. Analiza produselor referință	174
6.3.4.2. Analiza produselor generice	179

6.4. Discuții	182
6.5. Concluzii	185
CAPITOLUL 7. CONCLUZII PRIVIND INTERCOMPARABILITATEA DATELOR FURNIZATE DE DISPOZITIVELE COMPENDIALE DE TESTARE IVR PENTRU SEMISOLIDE TOPICE	187
7.1. Concluzii privind analiza intercomparabilității datelor de cedare in vitro generate de celulele verticale de difuzie și de imersie în testarea consistenței inter-șarjă	187
7.2. Concluzii privind evaluarea proprietăților reologice și confirmarea similarității microstructurale inter-șarjă	188
7.3. Concluzii privind adaptarea protocolului de evaluare a vitezei de cedare in vitro la caracteristicile formelor farmaceutice semisolide de tip cremă	188
7.4. Concluzii privind studiul intercomparabilității datelor de cedare in vitro prin analiza produselor semisolide topice multisursă	189
7.5. Concluzii generale	190
Bibliografie	191
Anexe	200

INTRODUCERE

Demonstrarea bioechivalenței formelor farmaceutice semisolide topice se realizează preponderent prin studii clinice (*clinical endpoint studies*), cu excepția celor care conțin corticosteroizi (Shah VP et al, 1992; US Department of Health and Human Services, 1997a) caz în care efectul vasoconstrictor (*blanching effect*) a fost corelat cu expunerea locală.

Variabilitatea datelor experimentale și lipsa sensibilității față de factorii de formulare se traduc printr-o reticență a producătorilor de medicamente de a efectua schimbări majore ale compoziției sau procesului tehnologic (Chang RK et al, 2013a,b; Yacobi A et al, 2014). Dr. Vinod P. Shah a realizat dezvoltarea și standardizarea unor modele de testare in vitro (Segers JD et al, 1997; Shah VP et al, 1999; Kikwai L et al, 2012) demonstrând relații și/sau corelații cu rezultatele metodologiilor in vivo (Shah VP et al, 2005).

Emiterea și implementarea unui ghid destinat evaluărilor variațiilor (US Department of Health and Human Services, 1997b) au fost fundamentate prin studii preliminare și ulterioare colaborative (Hauck WW et al, 2007; Shah V P et al, 2006).

Studiile de cedare in vitro (IVR) sunt destinate analizei impactului variațiilor de tip 2 sau a transferului între fluxuri tehnologice, însă rolul lor ca teste de performanță este în continuă extindere. Ghidul preliminar emis în anul 1998 pentru definirea principiilor de evaluare dermatofarmacocinetică (Higuchi WI et al, 1962) includea o opțiune de dezvoltare a dozelor inferioare prin proporționalitatea vitezelor de cedare cu cea superioară, pentru care existau dovezi privind bioechivalența cu produsul de referință.

Analiza similarității in vitro este diferită de cea aplicată în studiile de dizolvare și se bazează pe aplicarea modelului Higuchi (US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 1997) Procedura, adoptată și în noul capitol 1724 al USP (United States Pharmacopoeia 37, 2014) utilizează un calcul statistic neparametric, respectiv un interval de încredere 90% pentru raportul vitezelor individuale (n=6 - stadiul 1 sau 24 - stadiul 2; interval de acceptare: 75-133.33%).

În prezent există două ghiduri preliminare (Food and Drug Administration, 2012, 2014) care includ opțiuni in vitro ca alternativă la studiile clinice, iar Dr. VP Shah a propus recent (Shah VP et al, 2015) un sistem de clasificare bazat pe utilizarea IVR și evaluarea critică a similarității compoziției calitative (Q1) și cantitative (Q2).

Formele farmaceutice semisolide topice cu acțiune locală prezintă o serie de particularități care determină includerea lor în categoria produselor medicamentoase

speciale. Administrarea se realizează direct sau foarte aproape de locul de acțiune, iar contactul este dependent atât de proprietățile vehiculului semisolid, cât și de integritatea funcțională sau reactivitatea barierei biologice. Stratul cornos, cea mai importantă și extinsă interfața a organismului cu mediul, răspunde prin alterări de permeabilitate și nu numai, ceea ce conturează ideea unei adaptări continue, complexe și variabile intra sau inter-individuale. La rândul lor, gelurile, cremele sau unguentele pot prezenta diferite compoziții calitative și cantitative, iar componentele interacționează diferit în funcție de natura lor, de raportul cantitativ și de succesiunea de procese care au generat matricea semisolidă. Ca sisteme omogene sau eterogene, stabile sau meta-stabile, formele topice suferă transformări pe tot intervalul de valabilitate, cu amploare și consecințe diferite.

Atitudinea agențiilor de reglementare în domeniul medicamentului este conservatoare, în sensul în care abordarea uzuală este demonstrarea bioechivalenței pe baza studiilor clinice. Selecția indicației corelată cu viteza și cantitatea absorbită, cuantificarea cu acuratețe și obiectivitate a efectului, dar mai ales selecția numărului de subiecți prin estimarea variabilității intra-individuale și analiza statistică a datelor generate sunt doar câteva elemente care presupun costuri considerabile și întâzieri ale înregistrării alternativelor generice. Modificările majore de compoziție sau proces sunt evitate, impunând abordări similare.

Utilitatea testelor de cedare in vitro din produse semisolide a fost intens dezbătută. În primă instanță, utilizarea eșantioanelor de piele umană, provenită preferabil de la donatori sănătoși în urma intervențiilor de chirurgie plastică, a reprezentat prima aplicație acceptată oficial, deși singurul ghid disponibil a fost emis de Organizația de Cooperare Economică și Dezvoltare (2004a,b; 2011). Doza finită, aplicată în condiții non-ocluzive care reproduc administrarea in vivo, dar și folosirea de interfețe biologice reale, cu estimarea fenomenelor de partiție, permeație și resorbție, sunt argumente în favoarea biorelevanței. În același timp, hidratarea intensă prin contactul cu mediul receptor apos, absența proceselor metabolice specifice și a fluxului sangvin, alături de probleme de testare și menținere a integrității pentru perioade îndelungate impun precauții speciale pentru extrapolarea la expunerea in vivo, mai ales în tratamentele cronice. Variabilitatea performanțelor produsului este greu de separat de variabilitatea naturală a pielii. De menționat faptul că, în prezent, Agenția Europeană a Medicamentului (European Medicine Agency, EMA) a preluat studiile de permeație in vitro pentru evaluarea formelor farmaceutice transdermice (2014), dar nu ca unică modalitate de testare.

Comitetul de experți ACPS (Advisory Committee for Pharmaceutical Sciences) al agenției americane US-Food and Drug Administration au propus în anul 2003 (Yu L et al, 2003) trei niveluri de similaritate pentru produsele multisursă. Similaritatea Q1 corespunde utilizării acelorași excipienți. Similaritatea Q2 adaugă criteriul echivalenței cantitative, iar similaritatea Q3 presupune realizarea aceluiși aranjament microstructural, ca urmare a aplicării unui proces de fabricație. Nivelul Q2 permite variații de masă de 5%, însă este evident că dacă această diferență vizează un promotor de absorbție, trebuie furnizate dovezi privind impactul asupra biodisponibilității.

O similaritate extinsă pe toate cele trei niveluri reduce riscurile de non-echivalență terapeutică, ceea ce permite abordări metodologice alternative. Utilizarea membranelor artificiale are avantajul major al reproductibilității, iar caracterul inert permite evaluarea vitezei de cedare in vitro ca o proprietate intrinsecă a formulării semisolidelor topice. Diferențe semnificative ale mărimii particulelor suspendate generează viteze de dizolvare distincte în matricea suport, iar gradientul de concentrație transmembranar este dominantă difuziei. În mod similar, dimensiunea picăturilor fazei interne este corelată cu o anumită suprafață de partiție, iar în cazul sistemelor omogene vehiculul impune o rezistență transferului, corelată cu interacțiunile dintre componente.

Prima aplicație oficială a testelor de cedare in vitro, desfășurate în condiții de doză pseudo-infinită și ocluzive, pentru prevenirea modificărilor de compoziție prin evaporarea componentelor volatile, a fost analiza impactului variațiilor. Ulterior, US-FDA a propus o serie de ghiduri preliminare, adaptate fiecărei substanțe, forme farmaceutice și concentrații. Rolul cedării in vitro este dependent de complexitatea compoziției și a mecanismului de eliberare.

Farmacopeea Americană a propus în anul 2013 un capitol informativ dedicat dispozitivelor experimentale de tip celulă de difuzie (1724), pornind de la o variantă care includea teste de performanță atât pentru produsele topice, cât și pentru cele transdermice. Au fost incluse descrieri ale mai multor modele, putându-se distinge trei categorii:

- i) celulele verticale de difuzie (*vertical diffusion cells*, VDC), dispozitive distincte care nu utilizează infrastructura testelor de dizolvare (Shah VP et al, 1992, 1999; Segers JD et al, 1997);
- ii) celulele de imersie, transpuneri ale VDC la platforma specifică aparatului compendial 2 (Rege PR et al, 1998; Liebenberg W et al, 2004);

iii) adaptări la celulele în flux continuu (aparatură compendială 4, *flow through cells*; Liebenberg W et al, 2004). Multitudinea echipamentelor propuse, fiecare având parametrii operaționali specifici și etape de validare distincte, poate fi interpretată ca o stimulare a cercetărilor în domeniu, care să conducă la alegerea unui model optim. Una din politicile oficiale ale United States Pharmacopoeia este limitarea proliferării inutile a aparatelor compendiale (Cohen JL et al, 1990).

Scopul prezentei lucrări a fost evaluarea intercomparabilității datelor de cedare in vitro furnizate de diferite dispozitive experimentale compendiale. Au fost selectate formulări semisolide topice cu grade diferite de complexitate structurală: geluri hidrofile în care substanța activă, corticosteroid având caracter intens lipofil, a fost dizolvată în matricea semisolidă, respectiv sisteme de tip cremă conținând o entitate bazică parțial dizolvată într-un sistem bifazic. Produsele farmaceutice analizate au reprezentat serii diferite ale aceleiași formulări sau medicamente multisursă, cu diferențe asumate de compoziție, proces de fabricație, vârstă și microstructură.

În etape preliminare s-a încercat optimizarea parametrilor operaționali, cum ar fi selecția naturii, compoziției și volumului mediu receptor, viteza de rotație sau suprafața expusă a membranei suport inert. Ulterior, protocolul experimental optimizat a fost aplicat pe grupuri reprezentative de formulări, iar prelucrarea datelor a urmat recomandările SUPAC-SS (1997) de evaluare a similarității in vitro pentru nivelul 1 de comparație (șase unități individuale de testare). Relevanța rezultatelor a fost interpretată doar în corelație cu comportamentul reologic. Studiul microstructural a inclus teste rotaționale și oscilatorii, capabile să furnizeze informații adecvate despre caracteristicile vâscoelastice, capacitatea de etalare, intensitatea deformărilor sub influența unui stres mecanic controlat sau recuperarea structurală. Suplimentar, a fost verificată ipoteza conform căreia stabilirea unor relații între aranjamentul structural și particularitățile difuzionale este mai probabil în cazul determinărilor efectuate la temperatura specifică locului de administrare. De remarcat faptul că testele de cedare in vitro sunt singurele care dispun de criterii clare de acceptare a similarității.

Activitățile de cercetare descrise în partea experimentală au fost parțial susținute prin finanțarea acordată în cadrul proiectului “Burse doctorale și postdoctorale în sprijinul inovării și competitivității în cercetare (InnoRESEARCH)”, numărul de identificare al contractului: POSDRU/159/1.5/S/132395. Evaluările corelate de comportament reologic și analiză a profilelor de cedare in vitro din forme farmaceutice semisolide sunt contribuții la

studiul de validare a Sistemului de Clasificare a Medicamentelor Topice (Topical drug Classification System), desfășurat în cadrul Centrului de Științele Medicamentului.

Product Quality Research Institute din Statele Unite ale Americii finanțează în prezent un proiect coordonat de Dr. Vinod P. Shah, în cadrul Universității de Medicină și Farmacie „Carol Davila” București. Proiectul continuă direcțiile de cercetare trasate și descrise în prezenta lucrare și folosește metodologii validate cu prilejul cercetărilor doctorale descrise în partea experimentală a acesteia.

CAPITOLUL 3.

ANALIZA INTERCOMPARABILITĂȚII DATELOR DE CEDARE *IN VITRO* GENERATE DE CELULELE VERTICALE DE DIFUZIE ȘI DE IMERSIE ÎN TESTAREA CONSISTENȚEI INTER-ȘARJĂ

3.1. Introducere

Utilizarea testelor de cedare *in vitro* pentru formele farmaceutice semisolidе topice este în prezent limitată la două aplicații distincte. În primul rând, sunt parte a procesului de evaluare a performanței produselor după implementarea unor modificări controlate de compoziție sau proces, scopul fiind demonstrarea unui impact semnificativ asupra performanței (SUPAC-SS, 1997). Deși toate documentele de reglementare citate anterior subliniază în mod clar riscul unei relații între viteza de cedare *in vitro* și biodisponibilitatea după aplicarea locală pe piele sau mucoase, este evident faptul că adoptarea oficială sugerează o oarecare biorelevanță. Frecvent, termenul de biorelevanță nu este folosit, dar se presupune că o modificarea substanțială a rezistenței difuzionale pre și post-variație poate fi un indicator al unor modificări de expunere la substanța medicamentoasă în cauză. Cea de-a doua aplicație, aflată într-o directă legătură cu prima, este de identificare a unor schimbări majore pe durata studiilor de stabilitate (Chang RK et al, 2013a,b). Expunerea matricii semisolidе la condiții specifice de temperatură și umiditate poate altera microstructura, fie aranjamentul reciproc al excipienților, fie chiar mărimea particulelor fazei interne. Aceste modificări pot antrena, în cazul utilizării unei metode dezvoltată adecvat, având caracter discriminatoriu față de variabilele critice, scăderi sau creșteri ale vitezei de cedare *in vitro*.

Analogia evidentă în dezvoltarea și aplicarea testelor de cedare *in vitro cu studiile de dizolvare nu este valabilă în cazul procedurilor de control al calității de rutină. Testele bazate pe celulele verticale de difuzie sau alternativele de proiectare disponibile în prezent nu sunt utilizate în evaluarea consistenței inter-șarjă. Motivele sunt multiple, însă principalul*

este acela că metodologia impune o analiză comparativă, respectiv testarea simultană a două serii sau a două produse, pe fondul unei variabilități experimentale asumate. De remarcat faptul că această variabilitate este în principal asociată operatorului, Hauck WW et al (2004) menționând creșterea reproductibilității inter-laborator în urma unor sesiuni de instruire. Dificultăți majore pot fi întâlnite în stabilirea criteriilor de acceptare specifice. Pentru o metodologie care se bazează pe aplicarea unei doze pseudo-infinite și evaluări ale vitezei de cedare la echilibru printr-o membrană semipermeabilă și inertă din punct de vedere fizico-chimic, alegerea unei cantități cedate după un anumit interval de timp sau chiar a unui interval de variație a vitezei procesului difuzional nu este fezabilă.

În acest prim capitol al contribuțiilor proprii la tema de cercetare aleasă s-a avut în vedere prospectarea avantajelor și limitărilor utilizării metodologiilor de testare *in vitro* în controlul inter-șarjă. Scopul final a fost analiza intercomparabilității datelor experimentale furnizate de diferite dispozitive menționate în capitolul dedicat al Farmacopeei Americane (*Unites States Pharmacopeia, Chapter <1724>*, 2018).

S-au selectat trei loturi ale aceluiași produs, fabricate în condițiile respectării principiilor de similaritate a compoziției calitative și cantitative (Q1, Q2, conform Yu L et al, 2003).

Forma farmaceutică a fost cea de gel, asigurând o matrice semisolidă simplă în care principiul activ, un corticosteroid cu pronunțat caracter lipofil (testosteron) a fost prezent în stare de dispersie moleculară și în concentrație mare, atipică pentru administrarea locală (5%).

Cele trei loturi au permis simultan evaluarea consistenței inter-serie, a reproductibilității între diferite locuri de fabricație, precum și a transformărilor pe care vehiculul constituit pe baza unui compus macromolecular uzual (carbomer, formator de rețea) le suferă pe durata termenului de valabilitate.

3.2. Materiale și metode

3.2.1. Descrierea produselor semisolide analizate

Conform mențiunilor anterioare, studiul profilelor de cedare *in vitro* și analiza de similaritate, ca instrumente de evaluare a intercomparabilității datelor experimentale de difuzie, au fost efectuate pe un grup de geluri hidrofile simple, conținând testosteron 5%. Gelurile au reprezentat produsul referință (princeps, novator), înregistrat la nivel european și fabricat cel puțin în două locații. Formulările reprezentând trei loturi diferite aflate în diferite momente ale termenului de valabilitate declarat, au fost procurate din surse comerciale și utilizate fără prelucrări suplimentare, fiind codificate A, B și C. Un aspect

important este dat de condiționarea în doze individuale de 5 g, acestea fiind destinate aplicării locale pentru o acțiune sistemică (eliberarea corticosteroidului după aplicarea pe regiuni extinse ale pielii cu permeabilitate mare și partiția, respectiv distribuția acestuia până la nivel sistemic, parte a terapiei de substituție). Compoziția calitativă declarată a inclus carbomer 980, izopropil-miristat, etanol absolut, hidroxid de sodiu și apă purificată. Manipularea produsului s-a realizat rapid, prin deschiderea ambalajului primar și presarea lentă, fără expunere suplimentară la stres mecanic extrem și împiedicând pătrunderea aerului (schimbarea densității, evaporarea componentelor volatile și precipitarea testosteronului).

3.2.2. Protocolul de evaluare a profilelor de cedare *in vitro*

Studiile de cedare *in vitro* au fost efectuate pe trei categorii de dispozitive experimentale, respectiv pe două modele de celule verticale de difuzie și patru tipuri de celule de imersie. În toate cazurile, mediul receptor a fost reprezentat de un mediu hidroalcoolic conținând 30% etanol absolut (v/v) în apă purificată, După prepararea prin amestecarea componentelor în recipient închis etanș la temperatura camerei, degazarea s-a realizat prin filtrare sub vid (800 mBar) utilizând membrane confecționate din acetat de celuloză (diametrul mediu al porilor, 0.45μm). De menționat că pe durata degazării nu a fost crescută temperatura, evitându-se astfel pierderea de etanol și reducerea solubilității corticosteroidului în mediul receptor, pe durata testului. Ulterior, mediul a fost transvazat lent într-un vas cu pereți dubli, cuplat în serie cu celulele verticale de difuzie, respectiv într-un vas similar celor în care s-au amplasat celulele de imersie. În ambele situații, încălzirea mediului la 32±0.5°C s-a efectuat lent, fără elemente de agitare. Membranele artificiale au fost de tip polisulfonă (Tuffryn™, Pall Life Science, Mexic; diametrul mediu declarat al porilor 0.45 μm, diametrul membranei 25 mm), condiționate prin îmbibare în mediul receptor degazat timp de aproximativ 30 de minute.

Toate studiile de cedare *in vitro* au fost realizate pe câte șase unități individuale de testare, prin aplicarea aleatorie și alternativă a produselor (A și B, B și C, A și C, n=3*2). În cazul celulelor verticale de difuzie (model Hanson Microette, Hanson Research Inc., Statele Unite ale Americii), doza a fost determinată de aplicarea la nivelul unor inele dozatoare de politetrafluoroetilenă, având grosime de 1.5 mm. Aplicarea s-a realizat central și a fost urmată de etalare prin forfecare lentă cu ajutorul unei spatule metalice, pentru eliminarea unor eventuale bule de aer. Discurile ocluzive de sticlă au fost atașate, iar excesul de gel evacuat pe marginile ansamblului a fost îndepărtat cu hârtie de filtru. Excesul de mediu de pe suprafața membranelor a fost îndepărtat prin tamponare cu hârtie absorbantă. Ansamblul a fost atașat compartimentului receptor, umplut în prealabil cu mediu receptor sub agitare la

1000 rpm pentru îndepărtarea avansată a bulelor de aer. Sistemul de 24 de celule de 12 mL (*large cells*), respectiv de 6 celule de 7 mL (*standard*) a fost încălzit prin cuplare în serie pe trei verigi paralele prevăzute cu indicatoare de flux. Contactul etanș dintre compartimentul donor și cel acceptor a fost realizat prin adăugarea unui inel de aliniere și a unei cleme. Momentul $t=0$ a fost cel al inițierii agitării, prin bare magnetice prevăzute cu spirale de inox superficiale. Prelevarea a fost efectuată manual, după oprirea agitării timp de 30 de secunde, cu ajutorul unei seringi Hamilton fiind injectat în compartimentul receptor un volum de 1 mL mediu blank preîncălzit. A fost colectată fracțiunea de 0.5 mL finală. Pentru prevenirea fenomenului de retro-difuzie, dar și pentru a evita diluarea probei, injectarea mediului blank a fost lentă (aproximativ 1 minut/probă).

În cazul celulelor de imersie, doza aplicată (aproximativ 500 mg de gel) la nivelul compartimentului donor a fost egală. Celulele de tip *Ointment* (suprafață 1.767 cm²; Hanson Research Inc) au fost imersate în 150 mL de mediu cu compoziția și prelucrarea descrise anterior. S-au utilizat vase cu fund plat și volum util de 200 mL, evaporarea fiind limitată de capace din material plastic. Mini-paletele acoperite cu politetrafluoroetilenă au fost reglate la o înălțime de 1 cm de suprafața membranei, iar viteza de rotație a fost de 50 rpm. În cazul celulelor de tip *Enhancer* cu suprafața expusă de 0.5, 2 și 4 cm², vasele au fost prevăzute cu o protuberanță pentru evacuarea bulelor de aer formate în regiunea de ajustare a volumului compartimentului donor. Grosimea stratului de gel a fost aleasă astfel încât cantitatea totală de gel să fie egală cu cea utilizată în cazul celulelor *Ointment* (cu volum fix). Astfel, grosimea stratului de semisolid a fost maximă în cazul celulelor cu suprafața de 0.5 cm². Volumul prelevat și ulterior înlocuit cu mediu blank a fost de 2 mL.

Timpii de prelevare au fost următorii: 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 și 360 de minute.

Probele colectate au fost ulterior analizate cu ajutorul unor metode analitice validate. În secțiunea de dezvoltare a metodologiei *in vitro* a fost aplicată o metodă spectrofotometrică directă, iar ulterior a fost proiectată o metodă cromatografică.

Sistemul cromatografic a fost compus dintr-un echipament Agilent Instruments 1200, echipat cu pompă cuaternară (G1311A, DE62966721), termostat de coloană (G1316A, DE63070638), autosampler (G1329A, DE64768844) și detector tip șir de diode (G1315D, DE64258681). Condițiile de separare au fost următoarele: fază mobilă metanol – apă purificată (75 : 25), cu un debit de 1 mL / min și termostatare la 25°C, pe o coloană de tip ODS Hypersil (150 x 4 mm, lot 9405, SN 0680918Tm, particle size 5 μm, PN 30105-154030). Traseul a fost înregistrat la lungimea de undă de 244 nm, cu timp de achiziție de 5

minute și un timp mediu de retenție al testosteronului de aproximativ 3 minute. Domeniul de linearitate a fost 0.5 – 400 µg/mL.

Prelucrarea datelor a inclus corecția cu volumul individual al celulelor verticale de difuzie, respectiv adăugarea cantităților de analit îndepărtate din sistem ca urmare a prelevărilor. Profilele individuale de cedare *in vitro* au fost analizate prin aplicarea modelului Higuchi (legea radicalului; Higuchi WI, 1962). Panta dreptelor de regresie în reprezentarea cantității cumulate recuperată la nivelul compartimentului receptor, raportată la unitatea de suprafață în funcție de radical din timp a fost considerată viteza de cedare *in vitro*. Aceasta a fost utilizată în etapa următoare pentru calculul rapoartelor individuale test versus referință, corespunzător nivelului 1 de analiză a similarității *in vitro*. Absența unor diferențe semnificative între procesele difuzionale pentru diferite produse în aceleași condiții de testare a fost declarată prin aplicarea criteriului de acceptare 75-133.33% pentru intervalul de încredere 90%. Au fost formulate observații suplimentare bazate pe experiența dobândită în asamblarea celulelor, variabilitatea datelor generate și corelarea sau non-corelarea între dispozitivele compendiale aplicate.

3.4. Discuții

Un prim aspect important de menționat este alegerea concentrației etanolului în compoziția mediului receptor. Au fost efectuate teste preliminare în care nivelul acestuia a fost crescut până la 50%. Deși solubilitatea testosteronului s-a dovedit suficient de mare pentru asigurarea condițiilor sink esențiale, examinarea vizuală a gelurilor la sfârșitul testului, precum și aspectul profilelor medii de cedare *in vitro* au sugerat un foarte probabil fenomen de retro-difuzie. Este posibil ca transferul etanolului către compartimentul donor să fie atât de rapid (favorizat și de compoziția matricei semisolide) încât modificările consecutive de compoziție să nu reflecte adecvat microstructura. Pentru realizarea unor studii similare (teste de cedare *in vitro* bazate pe celule de imersie în cadrul echipamentelor de dizolvare) Baert B et al (2009) au utilizat un sistem tampon fosfat salin conținând 5% albumină bovină. Caracterul discriminatoriu obținut a condus la sugerarea unei armonizări transnaționale a cadrului de reglementare, pornind de la diferențe semnificative ale comportamentului biofarmaceutic. Ulterior, același grup de cercetare a propus o optimizare a condițiilor experimentale, prin utilizarea hidroxipropil-betaciclodextrinei (Baert B et al, 2010).

Datele experimentale confirmă consistența inter-șarjă, concluzia fiind independentă de natura sau particularitățile operaționale ale fiecărui dispozitiv. Deși este ușor de presupus că cele trei loturi ale produsului referință au prezentat un istoric diferit (intervale de timp de la

momentul fabricării, locuri de fabricație distincte cu posibile diferențe la nivelul parametrilor de operare, stocare în condiții diferite chiar în conformitate cu recomandările disponibile în prospect), schimbările posibile la nivelul structurii interne au fost minime. Rezistența difuzională în cadrul aceluiași dispozitiv experimental a fost comparabilă. Prezența unor timpi de latență cu valori crescute, chiar dacă în limita de 10% din durata totală a testului (mai mici de 36 de minute) a dovedit o stabilire mai lentă a echilibrului de transfer, explicabilă tot pe baza compoziției gelurilor. Concentrația testosteronului în matricea semisolidă este foarte apropiată de cea maximă, fapt confirmat de analiza vizuală pe durata testelor. Straturile de grosime redusă remanente pe spatulele cu care s-a realizat aplicarea au suferit transformări rapide, probabil prin evaporarea componentelor volatile, ceea ce a generat precipitări. Acest lucru a dovedit că activitatea termodinamică a testosteronului este maximă și explică rapoartele privind biodisponibilitatea. După aplicarea locală a 5 grame de gel 5%, datele disponibile în prospectul produsului indică o biodisponibilitate absolută extrem de mare, aproximativ 9-14% (emc+, 2018). Creșterile concentrației plasmatice sunt de 2.5 ng/mL peste nivelul bazal, iar fluctuațiile expunerii la nivel sistemic sunt reduse. Considerând caracteristicile fizico-chimice ale testosteronului, în special lipofilicitatea accentuată, rolul formulării este de eliberare rapidă, cu stocarea testosteronului în compartimentele lipidice și distribuția ulterioară lentă, dar constantă. De altfel, această particularitate a transformat tratamentul transdermic într-o referință pentru optimizarea alternativelor terapeutice (Dobs AS et al, 2004; Kaplun-Frischoff Y et al, 1997; HE W et al, 2008), biodisponibilitatea fiind mult mai mare comparativ cu cea orală (Tauber U et al, 1986; Tax L, 1987).

Profilele medii de cedare *in vitro* nu au prezentat alterări precum limitarea prin epuizarea rezervorului - donor, modificări ale modelului cinetic de eliberare sau atingerea unei limite de solubilitate a analitului. Eficiența agitării a fost adecvată, chiar dacă în cazul mini-paletelor s-a utilizat un nivel inferior al vitezei de rotație. Un aspect important este legat de analogia menționată în secțiunea introductivă între testele de dizolvare și cele de cedare *in vitro* pentru semisolide. Pentru formele farmaceutice convenționale, creșterea intensității de agitare este contrabalansată de o diminuare a caracterului discriminatoriu pentru variabilele critice de compoziție sau de proces. În cazul celulelor de imersie, ca de altfel pentru orice dispozitiv proiectat pe principiul difuzional, există o limită inferioară. Un strat limită se formează la interfața mediului receptor cu membrana care mediază contactul între cele două compartimente, nu la suprafața cu particulele de substanță activă. Parametrii hidrodinamici au o influență semnificativă doar în măsura în care îndepărtarea moleculelor

difuzate de la nivelul membranei nu este suficient de rapidă astfel încât permit reducerea gradientului de concentrație.

Concluziile privind similaritatea comportamentului *in vitro* erau de așteptat în cazul celor două modele ale celulelor verticale de difuzie statice. Diferențele constructive între celulele de 7 și 12 mL sunt date doar de forma compartimentului receptor, respectiv dimensiunile agitatorului magnetic și ale helixului superficial. Suprafața expusă a membranei este identică, 1.767 cm². În aceste condiții, viteza medie de cedare *in vitro* a fost de 86.05-91.59 μg/cm²/min^{0.5}, respectiv de 86.98-90.55 μg/cm²/min^{0.5}. Creșterea volumului la 12 mL comparativ cu dispozitivul standard (Shah VP et al, 1996, 1999; Segers JD et al, 1997) nu a modificat parametrii cinetici, nici concluzia privind similaritatea, ceea ce confirmă intercomparabilitatea datelor furnizate de cele două dispozitive experimentale.

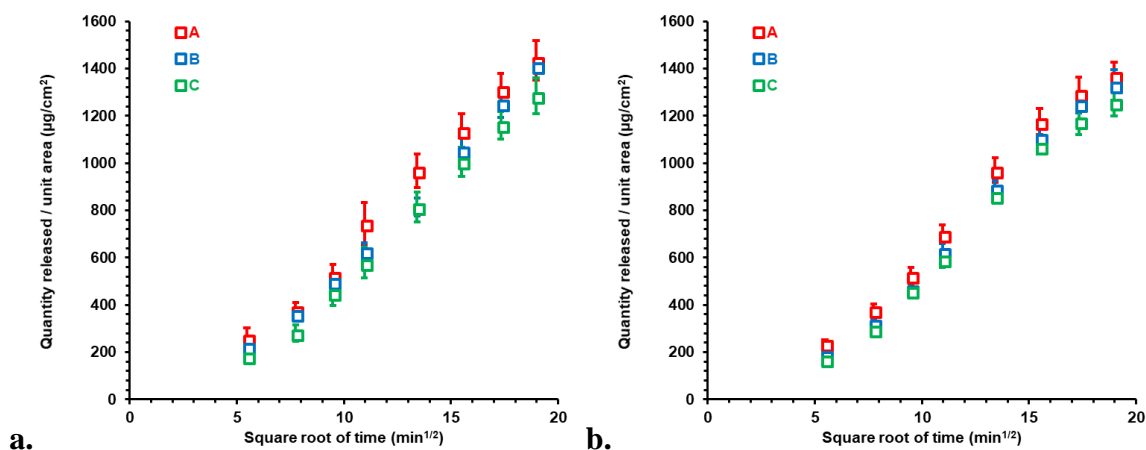


Figura 3.1. Profilele medii de cedare *in vitro* generate de cele două modele de celulă verticală de difuzie statică, VDC (a. 7 mL, standard; b. 12 mL; n=6, medie ± deviație standard)

O altă observație importantă este legată de analiza timpului de latență (10.26-16.32 minute pentru celulele standard și 10.77-15.88 minute pentru celulele de 12 mL). Acest parametru, alături de viteza de cedare *in vitro*, a prezentat dependența cea mai accentuată de particularitățile constructive. Pentru celulele de imersie, existența unui compartiment donor cu volum reglabil a determinat alegerea unei grosimi diferite a startului de gel. Justificarea este dată de aplicarea aceleiași cantități de formă farmaceutică, în consecință a aceleiași doze de substanță medicamentoasă și asigurarea aceluiași raport doză / solubilitate, esențial din perspectiva obiectivelor lucrării.

Într-o analiză critică a aplicabilității modelului Higuchi, Siepmann J et al (2011) au descris un set de condiții preliminare pentru interpretarea corectă a rezultatelor, raportul dintre grosimea matricei semisolide și suprafața disponibilă pentru difuzie fiind critică. În

cazul celulelor de imersie de tip *Enhancer*, acest raport a generat creșteri ale timpilor de latență de la 0.27-0.52 minute pentru suprafețe expuse de 0.5 cm² la 17.47-19.85 minute pentru 4.0 cm².

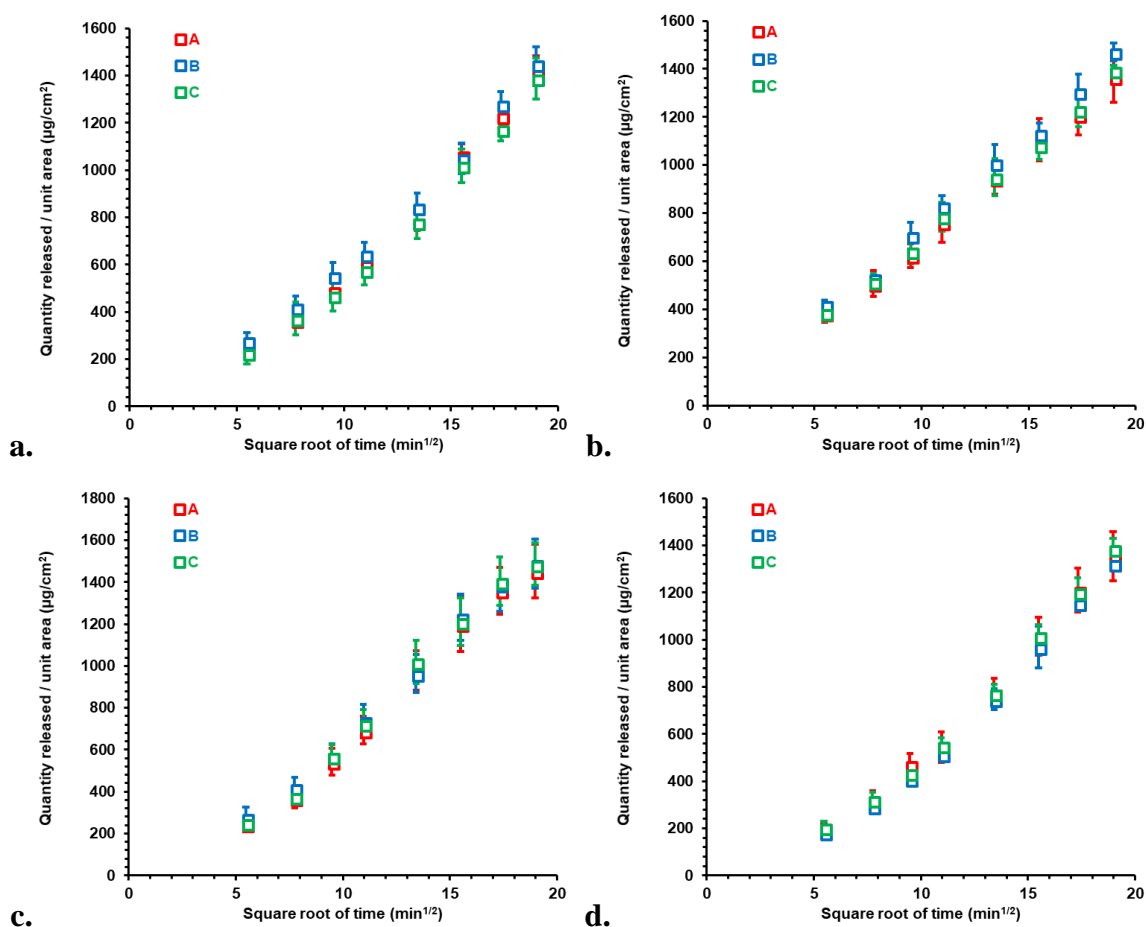


Figura 3.2. Profilele medii de cedare *in vitro* generate de celulele de imersie (a. Ointment, 1.767 cm²; b. Enhancer, 0.5 cm²; c. Enhancer, 2.0 cm²; d. Enhancer, 4.0 cm²; n=6)

În același timp, vitezele de cedare *in vitro* au prezentat variații de sub 20% (diferențe de maxim 17.67%). Acest lucru nu permite compararea directă a datelor generate de diferite subtipuri ale aceluiași dispozitiv, în schimb permite obținerea aceleiași concluzii privind similaritatea inter-șarjă. Intervalul de încredere 90% a fost situat în limitele de acceptare a echivalenței *in vitro*.

O ultimă observație este legată de similaritatea profilelor de cedare *in vitro* obținute în cazul celulelor *Ointment* și al celor *Enhancer* cu suprafață comparabilă. Este oarecum surprinzător că diferențele de formă, respectiv prezența unui volum static în jurul celui de-al doilea tip de dispozitiv, nu determină modificări cinetice, dar nici creșteri de variabilitate. În limitele protocolului dezvoltat și implementat, difuzia din gelul hidrofîl prin membrana

inertă către mediul receptor este procesul dominant, reflectând parametrii de calitate și performanță ai formei farmaceutice.

3.5. Concluzii

A fost analizată intercomparabilitatea datelor experimentale furnizate de diferite dispozitive compendiale aplicate în determinarea profilelor de cedare *in vitro* și a consistenței inter-șarjă în cazul a trei formulări semisolide topice de tip gel hidrofil conținând testosteron 5%. Natura intens hidrofilă a corticosteroidului a impus selecția unui mediu receptor hidro-alcoolic, în care solubilitatea substanței medicamentoase a permis respectarea condițiilor sink.

Datele experimentale au demonstrat reproductibilitatea parametrilor de calitate între cele trei loturi analizate, cu obținerea unei similarități a performanțelor *in vitro* în cazul comparării profilelor generate de același tip de celulă. În cazul VDC, variațiile constructive traduse în diferențe de formă și volum ale compartimentului receptor nu au generat diferențe cinetice semnificative, dispozitivele fiind interschimbabile.

Pentru celulele de imersie, modificări de volum, posibile în cazul unităților de tip *Enhancer* au indus variații ale timpilor de latență, fără alterarea concluziei privind similaritatea comportamentului *in vitro* inter-șarjă. Pentru suprafețe comparabile, vitezele de eliberare a testosteronului, precum și timpul necesar stabilirii echilibrului de transfer prin membrana artificială inertă au fost comparabile.

Concluzia generală este că dispozitivele menționate în capitolul informativ 1724 furnizează date intercomparabile în cazul produselor analizate, ceea ce facilitează transferul metodologic, însă doar în condițiile aplicării în studii comparative, profilele evaluate fiind generate în același timp și în cadrul aceluiași tip de celulă.

CAPITOLUL 4.

EVALUAREA PROPRIETĂȚILOR REOLOGIE ȘI CONFIRMAREA SIMILARITĂȚII MICROSTRUCTURALE INTER-ȘARJĂ

4.1. Introducere

Similaritatea microstructurală a fost menționată pentru prima dată oficial într-un raport al Advisory Committee for Pharmaceutical Sciences, ACPS (Yu L et al, 2003).

Pentru înțelegerea abordării grupului de experți, care ulterior a condus la conceptul actual de cumul de dovezi (*aggregate weight of evidence*; Lionberger R, 2004) este necesară descrierea contextului, respectiv a cadrului de reglementare disponibil în acel moment.

Studiile de dizolvare erau utilizate pe scară largă pentru demonstrarea consistenței inter-șarjă și pentru estimarea posibilelor performanțe in vivo ale formelor farmaceutice solide orale. Sistemul de clasificare biofarmaceutică, propus în anul 1995 de Amidon GL et al și instituit ca ghid în anul 2000 adusesse o nouă aplicație potențială, pentru entitățile active sau precursorii acestora cu solubilitate și permeabilitate mari. Ghidurile de evaluare a variațiilor recomandau extinderi ale utilizării. Nu în ultimul rând, ghidul SUPAC-SS (1995), descris pe larg în secțiunea care descrie stadiul actual al cunoașterii, era aplicat fără enunțarea unor cazuri care să infirme validitatea fundamentului științific. Validarea metodologiei dermatofarmacocinetice condusesse la concluzii divergente în privința gelurilor conținând tretinoin (Shah VP, 2005). Oarecum surprinzător dar explicabil prin reticența specifică agențiilor de reglementare, simultan cu ghidul preliminar de *skin stripping* (1998) a fost retrasă și componenta bazată pe testele de cedare in vitro, care includea:

- extrapolări între niveluri diferite de doză ale aceluiași produs generic, în condițiile demonstrării bioechivalenței concentrației superioare cu referința oficială și a similarității compoziției cantitative (similaritate Q2, în condițiile obligativității Q1);

- posibilitatea extinderii aplicabilității pe intervale mai largi de concentrație și a unei flexibilități mai mari a procesului de cercetare dezvoltare, cu evitarea studiilor clinice (EMA 1995, 1999) a căror sensibilitate față de factorii de formulare este redusă;

- continua lărgire a domeniului de aplicare în compararea produselor multisursă.

Revenind la principiile enunțate în raportul ACPS, similaritatea microstructurală este un concept larg, utilizabil și în cazul formelor farmaceutice solide orale. Testele de dizolvare având un caracter discriminatoriu adecvat sunt capabile să semnaleze diferențe de polimorfism sau de mărime a particulelor substanțelor medicamentoase, în condițiile în care acești parametri sunt critici pentru performanța produsului farmaceutic. În cadrul procesului de fabricație, modificarea unui parametru critic schimbă aranjamentul componentelor, ulterior interacțiunea cu mediul în care are loc procesul de dizolvare. Astfel, non similaritatea dovedită între serii diferite ale aceluiași produs pre și post-variație este în realitate o modificare de microstructură, tradusă în rezultate diferite ale unui test de performanță validat.

Pentru formulările semisolidale topice, comportamentul este prin definiție unul atipic, aceasta fiind una dintre caracteristicile care determină clasificarea ca forme farmaceutice speciale. Proprietățile intermediare între cele ale lichidelor și solidelor sunt esențiale pentru mecanismul de cedare in vivo. Etalarea la locul de administrare, evoluția în timp prin migrarea componentelor în cantități și cu viteze diferite, transformările sub influența

stresului mecanic și modificarea de temperatură descriu un ansamblu complex de fenomene care definesc particularitățile biofarmaceutice ale gelurilor, cremelor sau unguentelor. ACPS a propus pentru prima dată un set minim de determinări reologice, capabile să genereze informații esențiale referitoare la componentele elastică și vâscoasă, efortul de curgere sau profilul deformărilor și al recuperărilor structurale.

Pornind de la capacitatea asumată a testelor de cedare in vitro de a reflecta influența cumulată a mai multor factori critici, dintre care un rol important îl ocupă comportamentul reologic, următorul segment de evaluări specifice a fost reprezentat de analiza structurală. Pot fi enunțate cel puțin două motive. Primul este acela că marea majoritate a ghidurilor preliminare emise de US-FDA (aciclovir unguent, 2012; aciclovir cremă, 2017) care includ o opțiune in vitro prevăd evaluări oscilatorii și rotaționale, concordante cu documentul ACPS citat anterior. Al doilea, de importanță comparabilă, este de a genera un argument suplimentar în favoarea concluziilor capitolului anterior în privința intercomparabilității dispozitivelor compendiale. Similaritatea cedării in vitro trebuie să se coreleze cu o similaritate microstructurală, în caz contrar putând fi invocată lipsa de sensibilitate a uneia dintre metodologii (sau a ambelor). Astfel, cele trei formulări (loturi) de tip gel hidrofил conținând testosteron 5% au fost analizate printr-o serie de teste capabile să identifice natura și intensitatea interacțiunilor din interiorul matricei semisolide. Prospectiv, rezultatele ar fi putut semnala modificări induse de istoricul diferit al loturilor (moment sau loc de fabricație).

4.2. Materiale și metode

Analiza comportamentului reologic al celor trei loturi de a fost efectuată prin două seturi de teste, oscilatorii și rotaționale. S-a utilizat un reometru de tip Haake Mars 40 (Thermo Instruments, Germania), dotat cu element Peltier de control al temperaturii (MTMC Mars Temperature Module Controller) și un circuit extern cuplat la un termostat Haake SC100 / S5P. Dispozitivul de testare a fost de tip con - placă (diametru de 35 mm, unghi de 2°; C35 2°/Ti - 01160749), având un coeficient de expansiune termică de 1.100 $\mu\text{m}/^\circ\text{C}$. Distanța dintre vârful trunchiat al conului și placa termostată a fost de 101 μm pentru toate tipurile de teste. Determinările oscilatorii au inclus teste în modul cu control al tensiunii de forfecare (*shear stress amplitude sweep*), care a permis atât evaluări ale regiunii liniare vâsco-elastice, cât și ale efortului de curgere. Domeniul de variație a tensiunii de forfecare a fost de 0.2-200 Pa, cu achiziția de 40 de seturi de valori la frecvența de 0.5 Hz. Testele au fost precedate de o perioadă de 5 minute de termostatare și recuperare structurală. Determinarea efortului de curgere s-a realizat prin metoda tangentei. Ca analiză preliminară

de calibrare a parametrilor operaționali au fost înregistrate valorile modulelor elastic (G') și vâscos (G''), respectiv ale vâscozității complexe, în funcție de frecvența cu interval de variație 0.01 - 10 Hz. S-a aplicat o tensiune de forfecare constantă de 1 Pa, cu achiziția a 5 seturi de parametri și determinarea punctului de intersecție (egalizarea componentelor vâscoasă și elastică, *cross-over point*). Intervalul de recuperare structurală a fost redus la 120 de secunde.

Cele două teste rotaționale au fost de tip curbă de tixotropie și curbă de fluaj. În primul caz, intervalul vitezelor de forfecare a fost cuprins între 0 și 100 sec^{-1} , cu înregistrarea parametrilor în câte 50 de puncte pentru traseele ascendent și descendent, selectate în progresie logaritmică. Platoul staționar superior al vitezei de rotație a fost menținut timp de 10 secunde, cu achiziția a 10 seturi de valori. S-au determinat automat ariile corespunzătoare curbilor de deformare și recuperare structurală, precum și potențialele arii de histeresis.

Pentru evaluarea curbilor de fluaj, tensiunea de forfecare constantă de 10 Pa a fost aplicată timp de 60 de secunde, iar restructurarea a fost monitorizată 240 de secunde. Deformarea și recuperarea structurală au fost înregistrate la 60 de secunde de la îndepărtarea stresului mecanic, respectiv la sfârșitul testului.

Toate determinările au fost efectuate în triplicat, la două temperaturi relevante: $25 \pm 0.20^\circ\text{C}$, pentru simularea condițiilor de stocare, și $32 \pm 0.20^\circ\text{C}$, similar pielii expuse mediului.

4.4. Discuții

Analiza reologică a debutat cu evaluarea oscilatorie pe un domeniu larg al valorilor frecvenței (0.01-10 Hz). În afara acestui interval, curgerea și implicit răspunsul materialului este variabil, prin influența inerției specifice echipamentului sau prin inducerea de turbulențe. Pe tot profilul înregistrat și oarecum independent de valorile temperaturii, comportamentul a fost predominant elastic și cvasi-liniar (în reprezentare logaritmică), iar diferențele între cele trei serii au fost mai pronunțate la 25°C . Nu a putut fi evidențiat un punct de intersecție (cross-over), caracterizat de valori egale ale modulelor elastic și vâscos, astfel încât a fost selectată frecvența de 0.5 Hz pentru analiza ulterioară.

Regiuni vâscoelastice extinse au fost evidențiate la valori ale modulului elastic de aproximativ 120-130 Pa cu eforturi de curgere între 15.67 ± 0.33 Pa la 25°C și 14.00 ± 0.7 Pa la 32°C pentru seria codificată A și mici diferențe sesizate în cazul celorlalte două serii. Valori minime au fost observate în cazul seriei C, cu intervalul de timp din momentul fabricației minim. Consecutiv, capacitatea de etalare, considerată a fi invers proporțională cu efortul de curgere (Kruscio et al, 2008) a fost puțin influențată de temperatură.

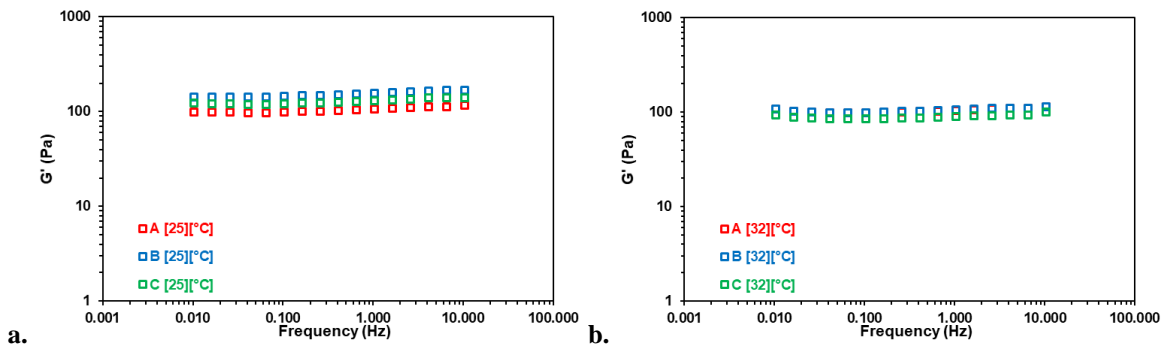


Figura 4.1. Profilul deformărilor înregistrate în cadrul testelor oscilatorii (modulul elastic, G') cu variația frecvenței ($n=3$) la 25 (a) și (b) $32\pm 0.2^\circ\text{C}$

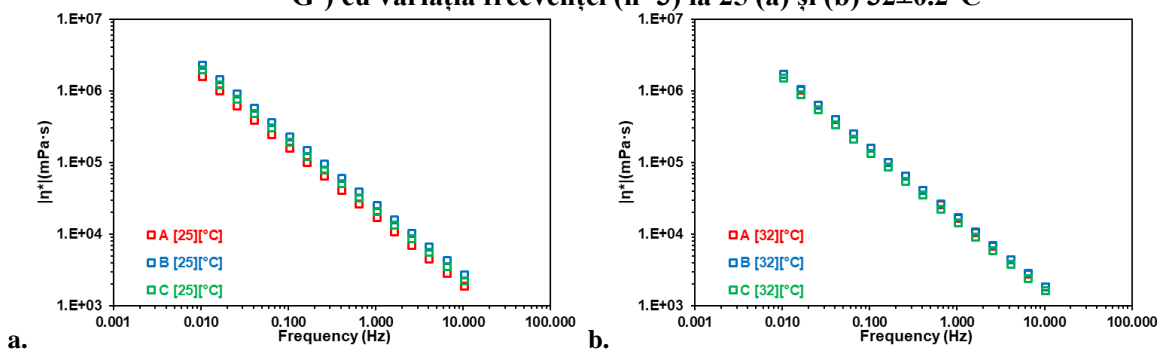


Figura 4.2. Variația vâscozității complexe în funcție de frecvența oscilațiilor ($n=3$) la 25 (a) și (b) $32\pm 0.2^\circ\text{C}$

Punctul de curgere a prezentat valori variabile (ca de altfel și valorile parametrilor critici, determinanți pentru capătul regiunii liniare vâscoelastice), dar a confirmat creșterea nesemnificativă de consistență pe durata de valabilitate a produselor.

Selecția punctelor de achiziție în progresie logaritmică a permis analiza adecvată a regiunilor profilelor de deformare induse de valori mici ale vitezei de forfecare ($0.01 - 1 \text{ sec}^{-1}$). O creștere aparentă a vâscozității a fost observată la $0.02-0.03 \text{ sec}^{-1}$. Comportamentul reologic a fost tipic pseudoplastic, cu arii de histerezis cuprinse între $683.97\pm 110.99 \text{ Pa/sec}$ și $860.50\pm 41.63 \text{ Pa/sec}$. A fost remarcată o corespondență între parametrii reologici generați de setul de teste oscilatorii și rotaționale, fără conturarea unor non-similarități. Acest lucru validează concluziile bazate pe vitezele de cedare in vitro și confirmă sensibilitatea metodologiei dezvoltate, independent de tipul de dispozitiv experimental.

Curbele de fluaj au permis elucidarea surselor de variație interșarjă, amintite în paragraful anterior. Concluzia generală este că deformarea elastică, dedusă din porțiunile inițiale ale profilelor, are valori cu aproximativ 5-10% la temperatura pielii. Diferențele sunt atenuate prin încălzire, explicația fiind dată de modificările intensității interacțiunilor dintre excipienți. Nu în ultimul rând, comportamentul atipic al seriei codificată C în cadrul

prezentului studiu a fost reconfirmat, alături de lipsa de relevanță în condițiile care simulează administrarea in vivo.

Figura 4.3. Profilul deformărilor induse în cadrul testelor oscilatorii prin controlul tensiunii de forfecare (n=3) la 25 (a) și (b) 32±0.2°C

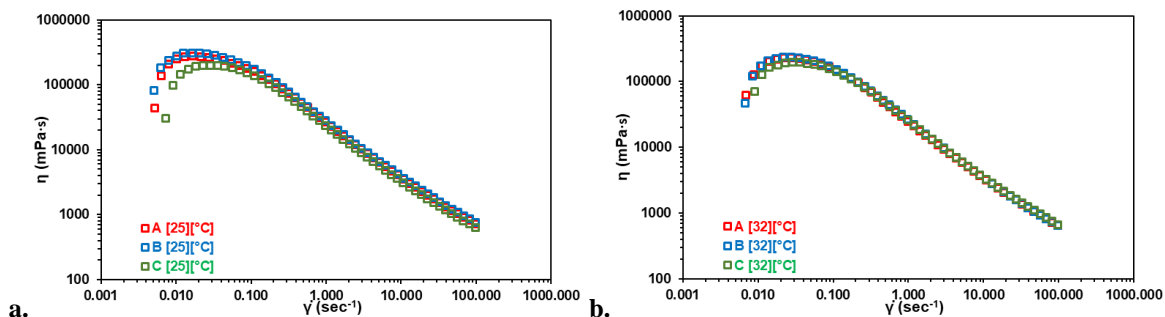


Figura 4.4. Prezentarea comparativă a rezultatelor testelor de tixotropie (n=3) efectuate la 25 (a) și (b) 32±0.2°C

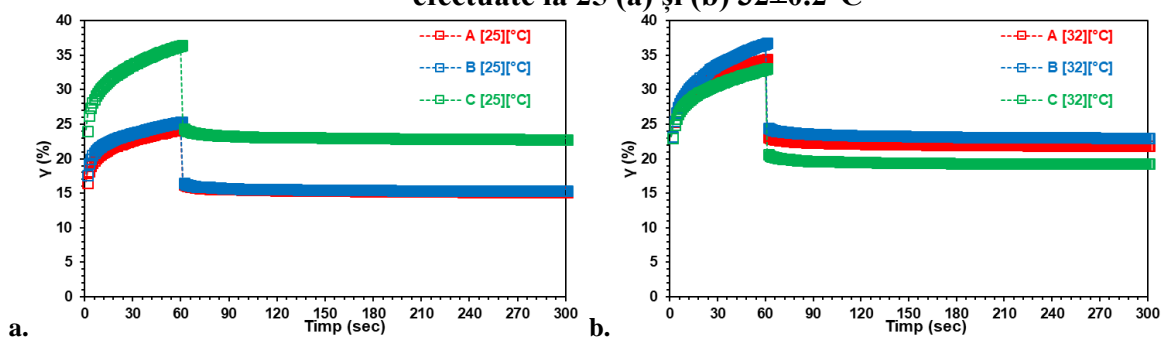


Figura 4.5. Curbele de fluaj obținute pentru cele trei serii de gel la 25 (a) și (b) 32±0.2°C (n=3)

Rezultatele prezentate susțin complementaritatea informațiilor generate de diferite metodologii de analiză microstructurală. Similaritatea răspunsului matricei semisolide în modul oscilator poate sugera o lipsă de caracter discriminatoriu, în timp ce curbilor de fluaj le poate fi asociat un caracter supra-discriminatoriu, cel puțin în condițiile care simulează stocarea produselor. Din aceste motive, efectuarea unui set de teste, dar mai ales variația temperaturii pe intervale reprezentative poate furniza o imagine adecvată asupra calității și posibilelor performanțe ale formelor farmaceutice semisolide topice. De menționat faptul că niciun ghid preliminar emis de US-FDA nu recomandă explicit o anumită valoare a temperaturii. Este posibil ca acest parametru să fie interpretat în contextul validării metodologiei în ansamblu, aplicantul urmând să aleagă și să justifice selecția. Astfel, testele de cedare in vitro pot fi utilizate pentru analiza semnificației analizei microstructurale.

4.5. Concluzii

Rezultatele analizei microstructurale, efectuată printr-o serie de teste oscilatorii și rotaționale recomandate în prezent de agențiile de reglementare în domeniul

medicamentului, au confirmat concluziile obținute anterior prin compararea profilelor de cedare *in vitro*. Vitezele de difuzie similare s-au corelat cu interacțiuni echivalente ca natură și intensitate în interiorul vehiculului semisolid în care substanța activă este complet dizolvată.

Datele experimentale corespund similarității pe toate cele trei niveluri de comparare (Q1, Q2 și Q3). Din perspectiva sistemului de clasificare a medicamentelor topice (*Topical drug Classification System, TCS*), analiza poate fi asimilată clasei 1, pentru care a fost propusă exceptarea de la necesitatea evaluărilor *in vivo* (*clinical endpoint studies*).

Similaritatea microstructurală a validat concluziile anterioare referitoare la intercomparabilitatea datelor bazate pe evaluări difuzionale prin membrane artificiale inerte. Compoziții similare având un aranjament intern echivalent în condiții de lucru date opun aceeași rezistență difuzională, prin urmare riscurile asociate non-bioechivalenței după administrare conform recomandărilor din prospect sunt minime.

În același timp, deși metodologiile individuale nu simulează perfect contextul aplicării pe piele sau mucoase, în cazul formulărilor simple de tipul gelurilor soluție complementaritatea testelor reologice și difuzionale poate reflecta adecvat diferențe semnificative de performanță. Însă testele de cedare *in vitro* sunt singurele care beneficiază de criterii de acceptare stabilite oficial.

CAPITOLUL 5.

ADAPTAREA PROTOCOLULUI DE EVALUARE A VITEZEI DE CEDARE *IN VITRO* LA CARACTERISTICILE FORMELOR FARMACEUTICE SEMISOLIDE DE TIP CREMĂ

5.1. Introducere

Evaluarea intercomparabilității datelor experimentale de cedare *in vitro* furnizate de diferite dispozitive experimentale compendiale, conform USP (1724), a impus extinderea planului de analiză prin includerea unui alt tip de formă farmaceutică, având un caracter mai complex. Din acest punct de vedere, un impact deosebit asupra performanțelor biofarmaceutice ale unei formulări administrate local îl au starea de agregare a entității active și caracterul hidro-lipofil al matricei semisolide care servește drept vehicul. Într-unul dintre capitolele anterioare a fost descris protocolul aplicat în cazul unei formulări hidrofile, conținând un corticosteroid complet difuzat și destinat distribuției la nivelul circulației sistemice. În secțiunea curentă este prezentată transpunerea acestui protocol, prin adaptarea parametrilor operaționali la particularitățile unei substanțe cu caracter intens hidrofob,

destinată unei acțiuni la nivelul barierei biologice primare, respectiv stratul cornos. Ketoconazolul este un antifungic des utilizat în terapie, aplicarea locală având avantajul major al unei eliberări țintite la locul infecției, cu evitarea reacțiilor adverse specifice administrării pe cale orală. În același timp, produse generice de tip cremă conținând 2% ketoconazol sunt disponibile pe piața europeană și prezintă variații considerabile din punct de vedere al compoziției calitative și cantitative. Non-similaritatea Q1 și Q2 a permis, cel puțin din punct de vedere teoretic, nu doar dezvoltarea unui set de metodologii de cedare *in vitro* adaptate caracteristicilor fizico-chimice ale substanței medicamentoase, dar mai ales verificarea caracterului discriminatoriu în contextul oferit de fiecare dispozitiv experimental compendial.

Una din etapele critice în selecția parametrilor de testare este alegerea mediului receptor. Condițiile sink, definite prin menținerea concentrației analitului în mediul receptor la un nivel de 10-33% din solubilitatea maximă în condiții de temperatură date, sunt obligatorii pentru aplicarea modelului matematic Higuchi. Acesta este esențial pentru determinarea vitezei de cedare *in vitro* ca o caracteristică a produsului, nu a entității active conținute. O abordare frecventă, permisă de cadrul de reglementare actual, este selecția mediilor hidro-alcoolice. Deși fără corespondent biologic, aceste amestecuri au în cele mai multe cazuri capacitate adecvată de solubilizare a analitului, astfel încât transferul transmembranar prin interfața artificială inertă nu este limitat de un gradient de concentrație. Pentru entități cu un anumit caracter hidrofil, aceste medii nu asigură doar solubilitatea, dar permit un unghi de contact adecvat difuziei, la contactul dintre membrana hidrofilă și formulări lipofile (Zatz JL et al, 1995; Ciolan DF et al, 2014)

În cazul ketoconazolului, proprietățile acido-bazice sunt cele mai ușor de utilizat în asigurarea condițiilor sink, solubilitatea în amestecurile binare amintite anterior fiind redusă. Prin analogie cu testele de dizolvare pentru formele farmaceutice solide orale, mediile apoase acide (0.1 sau 0.01 N acid clorhidric) induc protonarea bazei slabe. Astfel, forma ionizată este mai hidrofilă. Planul experimental a inclus produse mai complexe din punct de vedere microstructural, evaluate pe mai multe tipuri de dispozitive compendiale, dar și o analiză a impactului compoziției mediului asupra concluziei privind similaritatea *in vitro* pentru produse net diferite din punct de vedere al compoziției și al aranjamentului structural.

Cremele de ketoconazol conțin excipienți aleși atipic, din punct de vedere al permeabilității prin piele. Tipul de promotori de absorbție, mecanismele specifice de acțiune ale acestora și concentrațiile sunt selectate astfel încât să se prevină distribuția în profunzime, iar locul de exprimare a activității utile din punct de vedere al terapiei antifungice să fie

preponderent stratul cornos. Substanța medicamentoasă este distribuită în cel puțin două, dacă nu trei faze distincte, respectiv dizolvată în faza majoritară, partiționată în picăturile fazei interne și, frecvent, suspendată în matricea semisolidă. Complexitatea compoziției generează solicitări suplimentare din punct de vedere al agenției de reglementare. O anumită distribuție dimensională a particulelor suspendate sau a picăturilor fazei interne influențează în mod clar, uneori critic, efectul terapeutic, prin controlul exercitat asupra vitezei și cantității de entitate activă ajunsă la locul de acțiune. Demonstrarea echivalenței farmaceutice este dificilă în acest caz, chiar și pentru similarități Q1 și Q2. Distribuția dimensională trebuie privită ca parte a similarității microstructurale, Q3 (Yu L et al, 2003). În acest context, dacă există diferențe Q3, ele se manifestă ca non-similarități ale vitezei de dizolvare a particulelor solide și / sau de distribuție la interfața ulei / apă. O metodă de cedare *in vitro* dezvoltată adecvat și validată este capabilă să reflecte aceste diferențe doar dacă ele sunt semnificative. De altfel, este evident că impactul este limitat la distribuția către stratul cornos și nu schimbă permeabilitatea acestuia.

5.2. Materiale și metode

Metodologia de evaluare a profilelor de cedare *in vitro* a reprezentat o adaptare a celei descrisă anterior în cazul testosteronului, cu anumite particularități. În primul rând, conform mențiunilor din introducere, s-a adăugat planului experimental o etapă preliminară, incluzând selecția compoziției mediului receptor, date fiind particularitățile fizico-chimice ale ketoconazolului ca entitate hidrofobă cu un caracter slab bazic. S-a analizat fezabilitatea utilizării mediilor hidro-alcoolice, folosind două niveluri de concentrație ale etanolului absolut în apă purificată (30, respectiv 50%). Rezultatele obținute în primul caz nu sunt prezentate în cadrul capitolului, fiind marcate de o variabilitate accentuată. Suplimentar, a fost selectat un mediu cu caracter puternic acid (acid clorhidric 0.1N), care în pofida simplității compoziției și a biorelevanței reduse pentru administrarea locală, a fost singurul capabil să asigure conformitatea cu condițiile sink.

Data fiind probabilitatea crescută de apariție a fenomenului de retro-difuzie, schema de prelevare a fost modificată, iar durata testului a fost redusă la 240 de minute în cazul celulelor verticale de difuzie. Demonstrarea echivalenței cinetice între profilele de cedare *in vitro* în cazul gelurilor cu testosteron pentru dispozitivele de 7 și 12 mL, alături de existența unui număr mai mare de unități de testare în ultimul caz cu posibilitatea de efectuarea a studiului simultan pe ambele produse (n=6) a dus la alegerea ultimului model (*large cells*). În același timp, pe baza datelor preliminare, protocolul aplicat în cazul celulelor de imersie (4 variante, descrise anterior) a fost optimizat după cum urmează:

-schema de prelevare a fost extinsă la 6 ore, iar colectarea a fost efectuată la 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 și 360 de minute după inițierea agitării;

-volumul total de mediu receptor a fost menținut la 150 mL, însă volumul probei a fost redus la 1% din acesta (1.5 mL; posibil prin solubilitatea extrem de mare a ketoconazolului în mediu puternic acid);

-adăugarea unui nou model experimental prin folosirea celulelor în flux continuu și al adaptoarelor pentru semisolide.

În ultimul caz, a fost utilizat un sistem Erweka DFZ 720 (Erweka GmbH, Germania). Celulele cu diametru de 22.6 mm au fost condiționate prin amplasarea unei bile de sticlă de 5 mm la nivelul orificiului de admisie a mediului. S-au adăugat cantități de 7 g bile de sticlă având diametrul mediu declarat de 1 mm, pentru asigurarea unei curgeri cvasi-laminare (columnare, Fotaki N, 2011). Debitului mediului apos, preîncălzit la temperatura de $32 \pm 1^\circ\text{C}$ cu ajutorul unui sistem de termostatare tip DH2000i, a fost de 4 mL/min. Pompa cu pistoane tip HKP 720 a furnizat o curgere sinusoidală, la 120 de pulsuri / minut. Mediul receptor cu volum de 250 mL a fost omogenizat permanent prin bare magnetice și amplasarea recipientelor de sticlă pe o placă agitatoare multipoziției neîncălzită (*Velp Instruments magnetic stirrer*, 15 posturi, 200 rpm). Circuitele de admisie și evacuare au fost modificate prin acoperire cu material termoizolant. Colectarea manuală a probelor nu a fost urmată de înlocuirea mediului, schema fiind cea descrisă în paragrafele anterioare. Totodată, nu au fost utilizate filtre suplimentare (la capătul tijelor de prelevare sau în cadrul capătului colector al celulelor în flux continuu), membranele artificiale de tip polisulfonă asigurând o separare avansată a componentelor celor două compartimente. Independent de dispozitivul experimental, seringile de prelevare de tip Hamilton cu volum util de 1 sau 2 mL au fost cuplate prin racorduri de tip luer. În cazul celulelor de imersie sau al adaptărilor aparatului 4 (*flow-through cells*), agitarea a fost continuă, iar înlocuirea mediului prelevat s-a realizat lent, pentru a preveni alterări semnificative ale parametrilor hidrodinamici.

Imersia celulelor de tip *Enhancer*, utilizate în cadrul unui aparat de dizolvare Vankel VK7000, s-a efectuat cu ajutorul unei pensete cu o lungime de aproximativ 15 cm și deschidere adecvată. Bulele de aer aderente pe fața inferioară a inelului de fixare a membranei au fost înlăturate prin scufundare lentă, ușor oblică față de axul central. Astfel, s-a evitat metodologia alternativă care prevede adăugarea mediului degazat și preîncălzit la temperatura de lucru peste celula poziționată pe fundul vasului.

Analiza cantitativă a ketoconazolului s-a realizat, în funcție de stadiul analizei, prin două metode validate, respectiv spectrofotometrică directă (cu factor de diluție 10, în cazul

mediului acid clorhidric 0.1N, respectiv nediluat în cazul mediilor hidro-alcoolice, pentru produsele prezentate în prezentul capitol; $\lambda_{\max}=222$ nm) și cromatografică, ultima descrisă detaliat în ultimul capitol al secțiunii experimentale. Probele de control au fost preparate prin diluții succesive cu mediul receptor, pornind de la o soluție stoc de 400 $\mu\text{g/mL}$ (preparată în mediu acid sau metanolic).

Protocolul experimental a fost aplicat pentru două forme farmaceutice semisolide topice de tip cremă conținând 2% ketoconazol, dintre care produsul referință (codificat în continuare R, disponibil pe piața locală) și o alternativă generică (codificată T, formulare echivalentă farmaceutică disponibilă pe piața americană și cu o singură diferență din punct de vedere al compoziției calitative, prin urmare non-similare Q1; Ciolan DF et al, 2015).

5.4. Discuții

Profilele de cedare *in vitro* au fost dependente atât de complexitatea asumată a formei farmaceutice semisolide topice, cât și de condițiile experimentale. Conform mențiunilor anterioare, o primă etapă în alegerea parametrilor de testare a fost selecția mediului receptor, care să asigure o solubilitate adecvată a ketoconazolului și implicit, conformitatea cu condițiile sink. Astfel, s-a încercat transpunerea protocolului dezvoltat anterior pentru gelurile conținând testosteron 5%, deși diferențele structurale și fizico-chimice între cele două entități erau evidente. Anterior, metodologia a fost aplicată pentru analiza unor semisolide topice conținând metronidazole 0-75-1.00%, fiind demonstrată fezabilitatea abordării în evidențierea non-echivalenței farmaceutice (Ciolan DF et al, 2014). Utilizarea amestecurilor hidro-alcoolice conținând 30% etanol absolut în apă purificată a condus la exacerbarea impactului tuturor surselor de variabilitate, de la prelevarea manuală a probelor până la incidența bulelor de aer pe suprafața interioară a membranelor artificiale de tip polisulfonă.

O posibilă explicație este gradientul redus între cele două compartimente, generând cantități cedate mici. În consecință, procentul de agent solubilizant a fost crescut la 50%, caz în care reproductibilitatea datelor experimentale a fost superioară. Pentru elucidarea rolului solubilității în analiza similarității *in vitro* s-a apelat la o variantă uzuală în studiile de dizolvare pentru formele farmaceutice convenționale, respectiv utilizarea funcțiilor acido-bazice ale analitului. Pentru antifungicele cu caracter slab bazic (Zhou R et al, 2005), monografiile specifice recomandă majoritar medii apoase cu caracter acid pronunțat. Prin extrapolare, mediul acid clorhidric 0.1N a fost selectat ca o referință în privința asigurării unei solubilități adecvate. În aceste condiții pantele dreptelor de regresie au înregistrat valori de aproximativ 6 ori mai mari.

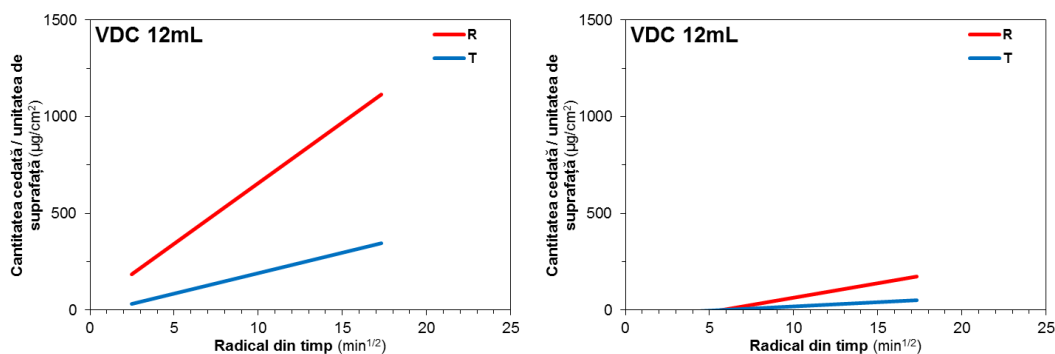


Figura 5.1. Dreptele de regresie calculate conform modelului Higuchi pentru profilele medii de cedare *in vitro* obținute în cazul dispozitivelor de tip celulă verticală de difuzie statică: (sânga) mediu acid clorhidric 0.1N; (dreapta) mediu receptor hidro-alcoolic, 50% etanol absolut în apă purificată

Ceea ce surprinde este faptul că această constatare nu s-a tradus în modificări ale caracterului discriminatoriu. Produsele de tip cremă selectate pentru analiza intercomparabilității au avut diferențe de comportament reologic demonstrate prin teste rotaționale simple (de tip buclă de tixotropie, determinată cu ajutorul unui vâscozimetru rotațional în condiții validate anterior în cazul metronidazolului; Ciolan DF et al, 2014). Totodată, este important de menționat că mediul apos fără componente alcoolice a permis difuzii rapide, fără timpi de latență semnificativi, chiar și prin contactul cu un vehicul lipofil. Rezultatele demonstrează impactul major al solubilității și mult mai redus al unghiului de contact, în contextul unei capacități de etalare și a unei consistențe adecvate. Ambele medii nu sunt biorelevante, dar parametrii calculați pot fi corelați cu rezistența opusă de matricea semisolidă difuziei ketoconazolului (Ciolan DF, 2014).

Ca și în cazul gelurilor conținând testosteron, concluzia privind similaritatea sau non-similaritatea comportamentului *in vitro* nu este influențată de tipul de dispozitiv experimental, ceea ce confirmă suplimentar intercomparabilitatea datelor generate, de această dată pentru o formulare în care substanța activă este distribuită într-un sistem complex (dizolvat sau suspendat în fazele apoasă și uleioasă).

Dependența vitezei de cedare *in vitro* și a cantităților cumulate recuperate la nivelul compartimentului receptor de suprafețele expuse ale membranelor a fost mult mai accentuată. Pentru celulele de tip *Enhancer*, scăderea vitezei a fost proporțională cu creșterea ariei (de la $142.79 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}^{0.5}$ pentru 0.5 cm^2 până la $64.43 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}^{0.5}$ pentru o suprafață de 8 ori mai mare; Ciolan DF, 2014). Geometria diferită și natura materialului slab reactiv (politetrafluoroetilenă) pot induce timpi de echilibrare termică distincți (Zatz JL et al, 1998), dar și un impact variabil al fenomenelor de retrodifuzie. Raportul vitezelor medii

de cedare *in vitro* s-a situat într-un interval larg, conform datelor din tabelul următor (29.71-58.96%).

Limitele

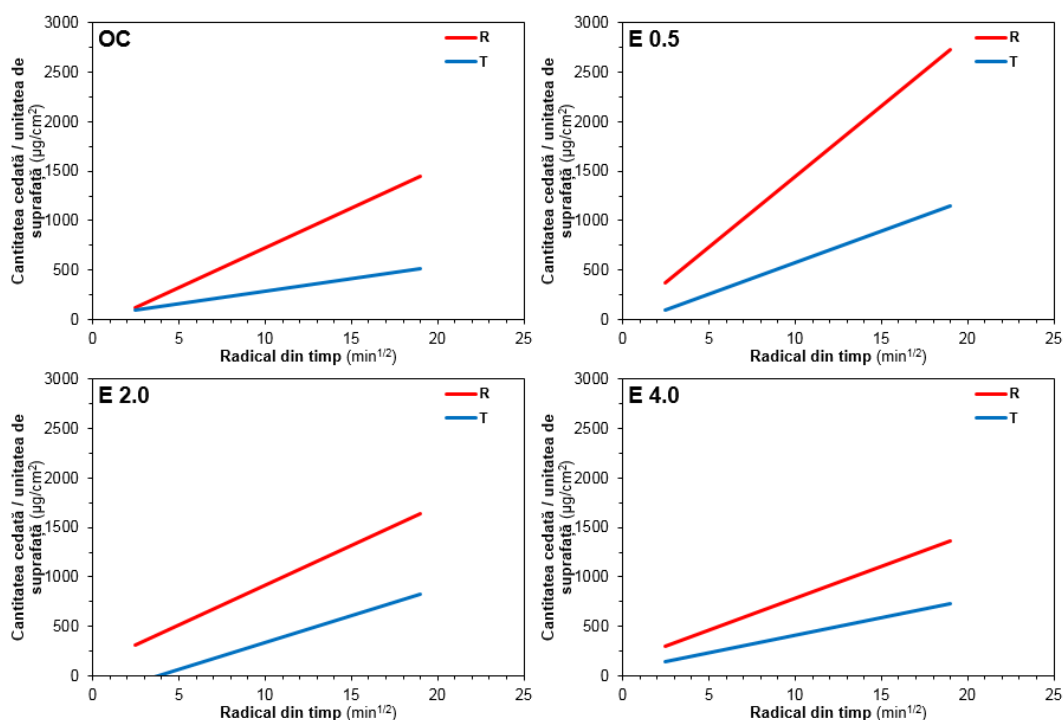


Figura 5.2. Dreptele de regresie calculate conform modelului Higuchi pentru profilele medii de cedare *in vitro* obținute în cazul dispozitivelor de tip celulă de imersie: (OC) Ointment; (E 0.5) Enhancer, 0.5 cm²; (E 2.0) Enhancer, 2.0 cm²; (E 4.0) Enhancer, 4.0 cm²

Compararea între celulele verticale de difuzie și cele de imersie trebuie să ia în considerare diferențele de direcție a cedării, riscurile diferite de manifestare a unor erori experimentale (de exemplu, reducerea suprafeței de difuzie mai probabilă pentru VDC), dar mai ales raportul diferit dintre cantitatea de semisolid aplicată și volumul de mediu. Concluzia deosebit de importantă, cel puțin din punct de vedere al obiectivelor temei de cercetare, este echivalența caracterului discriminatoriu sau supra-discriminatoriu. Diferențe de structură sunt traduse în diferențe difuzionale semnificative, dar prin relații de corespondență diferite. Independent de metodologie, intervalul de încredere 90% calculat conform recomandărilor compendiale s-a situat în afara limitelor 75-133.33%.

Adaptarea la particularitățile celulelor în flux continuu (aparatură compendială 4) a generat câteva observații importante pentru descrierea avantajelor și limitărilor potențiale ale acestui dispozitiv experimental. În primul rând, alegerea debitului de mediu receptor trebuie să reprezinte compromisul optim între două fenomene critice: înlăturarea rapidă a analitului de pe suprafața membranei și exercitarea unei presiuni suplimentare la nivelul suportului

mecanic al formulării. Caracterul discriminatoriu pare să fie comparabil cu cel demonstrat în cazul tuturor celorlalte modele.

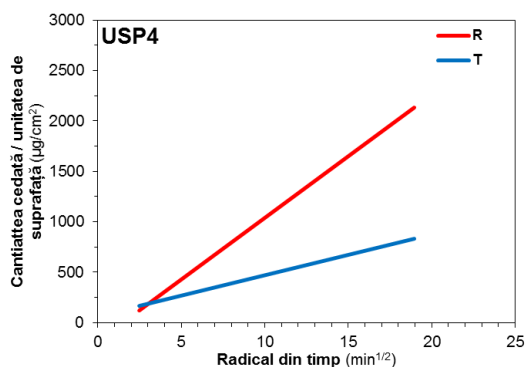


Figura 5.3. Dreptele de regresie calculate conform modelului Higuchi pentru profilele medii de cedare *in vitro* obținute în cazul adaptărilor la celulele în flux continuu (aparăt 4, *flow through cells*, 22.6 mm)

Este o opinie personală faptul că fenomenele de retrodifuzie sunt mai probabile în acest caz. Pentru cremele cu ketoconazol, natura lipofilă a matricei a limitat schimbările de compoziție ale donorului, dar fenomenul poate fi semnificativ în cazul vehiculelor hidrofile, mai ales anhidre. Incidența bulelor de aer este mai mare comparativ cu sistemele de tip celule verticale de difuzie, dar fluxul continuu și standardizat prin stratul de bile de sticlă reprezintă un avantaj. Una din limitările majore este dată de natura materialului din care sunt confecționate celulele, care limitează conținutul de componente alcoolice la 30% (în caz contrar suprafața interioară devenind mată și împiedicând inspectarea vizuală continuă. Astfel, o alternativă este utilizarea agenților tensioactivi, dar la concentrații extrem de reduse care să prevină formarea de spumă. Nu în ultimul rând, volumul de mediu receptor poate fi crescut, în ambele variante de operare (bucă închisă sau deschisă), dar cantitatea de mediu rezidentă la nivelul celulei este limitată.

5.5. Concluzii

A fost realizată o analiză a intercomparabilității datelor de cedare *in vitro* generate pentru două forme farmaceutice semisolidă topice de tip cremă conținând ketoconazol 2% prin utilizarea tuturor modelelor de celule de difuzie menționate în capitolul informativ 1724 al Farmacopeei Americane (*United States Pharmacopoeia*). Protocolul experimental a inclus etape preliminare de transpunere a metodologiei dezvoltate anterior pentru un gel hidrofil, respectiv în cazul unor formulări cu non-echivalențe farmaceutice evidente, precum și selecția compoziției mediului receptor.

Creșterea solubilității substanței active a determinat o reducere semnificativă a impactului erorilor experimentale și scăderea variabilității. Independent de dispozitivul experimental utilizat, caracterul discriminator al procedurii față de diferențele cunoscute de

aranjament microstructural a fost menținut, non-similaritatea comportamentului *in vitro* fiind observată în toate cazurile.

Există însă particularități cinetice, respectiv o dependență specifică între suprafața de membrană artificială expusă mediului și viteza de cedare *in vitro*. Posibile cauze sunt reactivitatea materialelor (coeficienții de transfer termic), care induce un profil caracteristic al transformărilor dependente de temperatură, în funcție de forțele coezive ale fiecărui produs analizat. Dintre toate dispozitivele experimentale aplicate, adaptările la celulele în flux continuu par să genereze cele mai dificile procese de dezvoltare metodologică, fiecare avantaj evident fiind însoțit de o limitare (volum specific, variația suprafeței de contact, precauții în selecția compoziției mediului receptor).

CAPITOLUL 6.

STUDIUL INTERCOMPARABILITĂȚII DATELOR DE CEDARE IN VITRO PRIN ANALIZA PRODUSELOR SEMISOLIDE TOPICE MULTISURSĂ

6.1. Introducere

Conform ghidurilor și monografiilor compendiale în vigoare, testele de cedare *in vitro* aplicate în cazul formelor farmaceutice semisolide nu sunt aplicabile în cazul comparărilor între produsele multisursă. În același timp, numeroase ghiduri preliminare emise de agenția americană de reglementare în domeniul medicamentului includ o opțiune *in vitro*. Importanța acestora în cadrul analizei globale a riscurilor de non-bioechivalență este diferită, în primul rând în funcție de complexitatea microstructurală. Emulsiile oftalmice de ciclosporină sau difluprednat au ca parametru critic distribuția dimensională a particulelor fazei interne, dar și impactul procedurilor de diluție, specifice locului de administrare. Conform celor menționate anterior, fundamentul științific al ghidului de evaluare a variațiilor SUPAC-SS, documentul de la care rolul metodologiilor *in vitro* a crescut substanțial, include sensibilitatea față de diferențe dimensionale. Pentru crema cu aciclovir 5%, US-FDA solicită și teste de permeație prin eșantioane de piele provenite de la donatori sănătoși. Justificarea este dată de faptul că substanța antivirală acționează în straturile mai profunde ale pielii, iar parametrii permeației și ai penetrării (flux la echilibru, timpi de latență, coeficient aparent de partiție etc.) sunt influențați în mod diferit și cu amplitudini diferite de numeroși factori critici de compoziție sau de structură. În acest context, se cuvine reamintit faptul că substanța antifungică selectată pentru analiza intercomparabilității datelor generate de diferitele dispozitive experimentale are un profil de distribuție particular. Partiția la interfața semisolid - piele este limitată la nivel superficial, ceea ce reduce riscurile

biofarmaceutice și, consecutiv, crește relevanța metodologiilor alternative in vitro, chiar și prin utilizarea membranelor artificiale inerte.

Ketoconazolul este distribuit în trei faze distincte, componente ale vehiculului farmaceutic de tip cremă. Din punct de vedere teoretic, diferențe de dimensiuni ale particulelor sau picăturilor fazei interne trebuie să genereze comportamente reologice distincte, prin modificări ale naturii și intensității interacțiunilor responsabile de structura de tip semisolid. Rezultatele obținute în cazul gelurilor au confirmat utilitatea determinărilor complementare, oscilatorii și rotaționale, dar mai ales rolul comparărilor pe două niveluri de temperatură. Efortul de curgere este un element critic nu doar pentru estimarea capacității de etalare la locul de administrare (Kryscio DR et al, 2008), dar și pentru etapele premergătoare (ambalarea primară, evacuarea dozelor unitare din tub sau flacon etc.). Pentru o frecvență dată a oscilațiilor, nivelul modulului elastic în regiunea liniară vâscoelastică semnalează intensitatea interacțiunilor dintre excipienți la un anumit moment. Buclele de histeresis confirmă dependența de efortul mecanic, dar și de timp a deformărilor și regenerărilor structurale. Toate aspectele menționate anterior influențează performanța in vivo, iar testele de cedare in vitro discriminatorii pot sugera limite de la care presupusul efect clinic este modificat,

În cadrul acestui ultim capitol de contribuții originale la tema de cercetare sunt descrise evaluări duale, difuzionale și reologice, aplicate la nivelul unui sub-grup reprezentativ de formulări de tip cremă. Protocolul experimental reprezintă optimizări realizate pe baza concluziilor generate anterior. Scopul a fost acela de a oferi argumente suplimentare pentru diferențele confirmate de toate dispozitivele compendiale, dar și de a testa utilitatea setului de determinări în cazul comparării produselor multisursă.

6.2. Materiale și metode

6.2.1. Descrierea produselor analizate

Setul de produse analizate a inclus patru formulări referință și două alternative generic, ultimele autorizate pe piața europeană. Două dintre cele patru formulări referință au reprezentat creme înregistrate de același producător, sub aceeași denumire, dar autorizate în țări cu legislație distinctă pentru înregistrarea medicamentelor (Germania, cod R1, respectiv China, cod R2). Este posibil ca locul de fabricație să fie diferit, însă este ușor de presupus similaritatea Q1 și Q2. Referințele codificate R3 și R4 au fost procurate din aceeași țară europeană, dar termenele de valabilitate au sugerat istoric similar dar vârste (intervale de timp de la momentul fabricării) diferite. Cele două formulări generice au prezentat non-similarități Q1 reduse (produs codificat T1) sau marcate (produs codificat T2). Suplimentar,

analizele descrise în subcapitolele următoare au fost aplicate și celor două produse evaluate anterior, menținându-se codificarea (R și T).

6.2.2. Scurtă prezentare a protocolului experimental utilizat pentru analiza profilelor de cedare in vitro

Protocolul studiilor de cedare in vitro a reprezentat o transpunere a celui dezvoltat și optimizat conform descrierii disponibile în capitolul anterior. S-au utilizat celulele verticale de difuzie statice cu volum al compartimentului receptor de 12 mL, membrane inerte semipermeabile de polisulfonă și mediu de tip acid clorhidric 0.1N, capabil să asigure condițiile *sink*. Doze pseudo-infinite de aproximativ 300 mg au fost aplicate în condiții ocluzive. Testele s-au efectuat pe câte 6 celule la $32\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, iar durata a fost extinsă la 360 de minute (8 probe, dintre care patru la intervale de 30 de minute).

6.2.3. Analiza cantitativă a ketoconazolului printr-o metodă cromatografică

Determinarea concentrațiilor ketoconazol în probele prelevate (0.5 mL) s-a efectuat fără diluare, prin utilizarea unei metode cromatografice validate. Pe scurt, s-a utilizat o coloană cromatografică tip Luna 3u C18(2) 100A, 150 x 4.60 mm, part.no. 00F-4251-E0, S/N: 457452-16, B/N: 5292-35, Phenomenex HPLC Columns. Faza mobilă a fost compusă dintr-un amestec acetonitril : metanol : trietilamină 0.1% = 40 : 30 : 30, la temperatura de 40°C și un debit de 1 mL/min. Traseul cromatografic a fost monitorizat la lungimea de undă de 242 nm, cu un timp de analiză de 8 minute / probă. Timpul de retenție al ketoconazolului a fost de aproximativ 5.5 minute. Probele de calibrare și de control au fost preparate prin diluții succesive în mediu receptor, iar injectarea probei a fost urmată de spălarea acului cu apă purificată.

6.2.4. Evaluarea comparativă a comportamentului reologic

Data fiind complexitatea microstructurală a cremelor analizate și considerând setul comun de teste solicitate de US-FDA în cadrul ghidurilor preliminare (draft guidance) care includ o opțiune in vitro de demonstrare a bioechivalenței, studiul reologic a inclus doar două tipuri de determinări: i) teste oscilatorii efectuate prin controlul tensiunii de forfecare ($n=2$); ii) testele de tixotropie ($n=3$). Evaluările au fost făcute în triplicat, la temperaturile de 25 și $32\pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Parametrii operaționali au fost identici celor utilizați anterior în cazul gelurilor hidrofile.

6.4. Discuții

Verificarea principiilor aplicate și a concluziilor obținute în cazul unor forme farmaceutice semisolide topice cu similarități sau non-similarități microstructurale cunoscute se poate realiza doar prin extinderea protocolului experimental la un grup mai larg

de produse multisursă. Am amintit în capitolul anterior faptul că diferențele semnificative sau ne semnificative statistic pot fi obținute pe fondul unui caracter discriminatoriu sau non-discriminatoriu în raport cu variabilele critice de compoziție și de proces. Compararea produselor non-echivalente farmaceutic nu are relevanță, întrucât reflectă avantaje sau limitări metodologice, nu calitatea unei formulări. Preambulul capitolului compendial 1724 preia una din restricțiile majore impuse de ghidul SUPAC-SS, și anume fezabilitatea redusă pentru compararea unor semisolid fabricate de producători diferiți. Testele de cedare in vitro oferă informații cumulative, adică traduc simultan influența istoricului formei farmaceutice, nu doar a compoziției. Prin istoric se înțelege ansamblu parametrilor operaționali, dar și transformările inerente pe durata stocării produsului, până la eliberare și administrarea in vivo. În sens mai larg, istoricul include și modificările de aranjament intern al componentelor în interiorul ambalajului primar, cele mai probabile fiind destructurările și schimbările de densitate prin înglobarea de aer.

Grupul celor patru formulări referință, codificate R1-R4, au permis evaluarea simultană a variabilității induse de vârsta diferită sau de locul de fabricație, toate în cazul unei formulări complexe din punct de vedere al stării de agregare a substanței medicamentoase. Astfel, viteza medie de cedare in vitro a fost cuprinsă între 50.25 și 61.05 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}^{0.5}$. Surprinzătoare au fost diferențele între cele două perechi ilustrând cazurile prezentate anterior, respectiv similaritatea proceselor difuzionale generate de produse fabricate în locații diferite și non-similaritatea loturilor fabricate de către același producător.

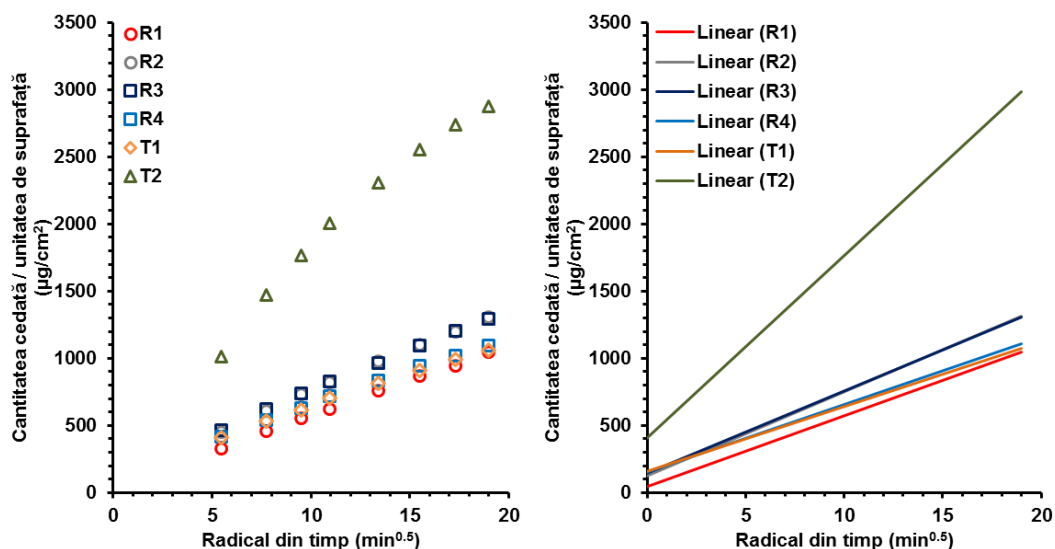


Figura 6.1. Profilele medii de cedare in vitro obținute în cazul produselor multisursă de tip cremă conținând 2% ketoconazol și dreptele de regresie generate conform modelului Higuchi

Este ușor de presupus că, în dezvoltarea unei alternative generice, ținta de calitate trebuie să fie reprezentată de referința oficială în spațiul în care se va solicita înregistrarea. În același timp, riscurile de non-echivalență pot fi reduse prin studierea mai multor loturi ale produsului referință, ilustrând în mod optim diferite etape din perioada de valabilitate declarată.

Compoziția net diferită a produsului generic codificat T2 și consistența redusă remarcată încă din faza de aplicare la nivelul membranelor artificiale au fost corelate cu viteze de difuzie aproape duble ($135.58 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}^{0.5}$). Calculul intervalelor de încredere 90% a confirmat acest comportament distinct. În cazul produsului T1, gradul avansat de similaritate Q1 a permis obținerea similarității in vitro cu formulările R1 și R4. Trebuie reamintit faptul că rezultatele corespund nivelului 1 de comparare, iar pentru produsul R3 a fost observată o variabilitate experimentală mai mare. Este posibil ca analiza la nivelul 2 (n=18) să confirme similaritatea.

Din punct de vedere al comportamentului reologic, rezultatele au confirmat concluziile privind diferențele dintre cele două produse analizate și prezentate în capitolul anterior. Non-similaritatea microstructurală a fost mai puțin evidentă din punct de vedere al efortului de curgere (7.19 Pa pentru R versus 9.24 Pa pentru T, la temperatura pielii), dar accentuată din perspectiva valorii modulului elastic în cadrul regiunii liniare văscuoelastice (2145.5 Pa, respectiv 954.65 Pa, la 32°C). Această observație susține ipoteza de lucru conform căreia, prin dezvoltarea unei metodologii în conformitate cu un set de principii (doză infinită, condiții ocluzive, solubilitate adecvată etc.), cedarea in vitro chiar și printr-o interfață artificială poate semnala non-echivalențe. În privința unui caracter supradiscriminatoriu, posibil dacă se consideră faptul că producătorul formulării R a obținut autorizarea, se cuvine reamintită procedura de autorizare, bazată majoritar pe studii clinice. Conform raportului publicat de N'Dri Stempfer B et al (2009; citat de Ciolan DF et al, 2014) o cantitate redusă de antifungic (econazole) se regăsește la nivelul stratului cornos, după administrare locală. În același timp, excipienții participă în mod activ la generarea efectului terapeutic global (EMA, 2014). În concluzie, studiile clinice care au stat la baza autorizării au o sensibilitate redusă față de diferențele confirmate în cadrul acestui capitol sau aceste diferențe nu sunt relevante din punct de vedere clinic.

La nivelul grupului de produse multisursă, non-similaritatea vitezelor de cedare in vitro poate fi parțial corelată cu comportamentul reologic. Legătura între cele două seturi distincte de date este ușor de stabilit pentru produsul generic T2, în cazul căruia a fost înregistrată o valoare minimă a ariei de histerezis. Consistența redusă și interacțiunile mai

slabe dintre componente au indus deformări rapide și intense, iar recuperarea structurală după îndepărtarea stresului mecanic este mai avansată. Creșterea temperaturii de la 25 la 32°C a amplificat acest comportament.

În concluzie, relevanța protocolului experimental dezvoltat anterior a fost confirmată, pe de-o parte de studiul comportamentului reologic prin două teste simple, recomandate de US-FDA pentru demonstrarea similarității Q3. Pe de altă parte, extinderea grupului de formulări semisolide a demonstrat sensibilitatea testelor de cedare in vitro atât față de variabilele de compoziție, cât și față de modificările de structură care au loc în termenul de valabilitate.

6.5. Concluzii

Metodologia dezvoltată anterior a fost aplicată pe un grup de produse multisursă de tip cremă conținând ketoconazol 2%. Studiul comportamentului reologic a inclus un test rotațional (bucla de tixotropie) și un altul oscilator (analiza componentelor elastică și vâscoasă prin controlul tensiunii de forfecare la frecvență constantă). Ca parametri relevanți au fost analizate ariile de sub curbele de deformare, efortul de curgere și caracteristicile regiunii liniare vâscoelastice, care ilustrează capacitatea de etalare sau natura și intensitatea forțelor interne coezive. Studiul profilelor de cedare in vitro s-a realizat pe baza celulelor verticale de difuzie statice, iar interpretarea rezultatelor s-a bazat pe utilizarea datelor obținute anterior pentru două formulări non-similare Q1, Q2 și Q3.

S-a observat o corespondență între performanțele in vitro și comportamentul reologic, confirmând utilitatea comparărilor între produsele multisursă doar în contextul unor variații reduse, cunoscute ale compoziției. Istoricul diferit al matricilor semisolide poate fi interpretat ca un argument suplimentar în defavoarea utilizării ca teste de control al calității de rutină. Totodată, se impun precauții speciale în cadrul studiilor de stabilitate, mai ales prin aplicarea unor condiții accelerate.

Din punct de vedere al dezvoltării unei formulări generice, rezultatele obținute pentru produsul referință sugerează necesitatea evaluării mai multor loturi, inclusiv cu istoric diferit, ca etapă critică pentru stabilirea țintei de calitate. Existența unor cazuri de non-similaritate între loturi diferite ale acestuia din urmă poate fi utilizată pentru alegerea și / sau extinderea criteriilor de acceptare a echivalenței, fiind ușor de argumentat că intervalul descris de cele două extreme corespunde unor performanțe in vivo comparabile.

CAPITOLUL 7.

CONCLUZII PRIVIND INTERCOMPARABILITATEA DATELOR FURNIZATE DE DISPOZITIVELE COMPENDIALE DE TESTARE IVR PENTRU SEMISOLIDE TOPICE

7.5. Concluzii generale

Importanța metodologiilor de cedare in vitro este ilustrată nu doar de utilizarea în contextul analizei variațiilor formelor farmaceutice speciale cu administrare locală, ci mai ales de numărul remarcabil de ghiduri care includ opțiunea de evaluare alternativă a bioechivalenței. Acestea sunt adaptate particularităților de administrare, mecanismului specific de eliberare a entității active și gradului de complexitate a compoziției și microstructurii. În ansamblu, riscurile unei performanțe in vivo suboptimale trebuie să fie minime.

Multitudinea dispozitivelor compendiale de testare, proiectate prin analogie cu celulele de difuzie Franz, frecvent utilizate în cadrul studiilor de permeație prin eșantioane de piele sau mucoase, este atipică. Se poate estima ca versiunile revizuite ale capitolului informativ dedicat să marcheze o opțiune pentru unul dintre dispozitive. Foarte probabil acesta va fi modelul de celulă verticală de difuzie statică, pentru care există o experiență îndelungată, inclusiv încercări de calificare operațională și standardizare. În același timp, celulele de imersie sau adaptările la particularitățile aparatului 4 vor continua să fie utilizate, pe baza numeroaselor avantaje enunțate și demonstrate anterior.

Pentru transferul metodologic sau optimizarea procedurilor de lucru, dovezile privind intercomparabilitatea rezultatelor furnizate de diferite dispozitive sunt esențiale. Opțiunea este cel mai frecvent bazată pe familiarizarea operatorului cu un anumit echipament, respectiv cu înțelegerea principiilor științifice și a semnificației rezultatelor. Frecvent sunt necesare analize complementare care să identifice sursa non-similarităților sau caracterul supra-discriminatoriu.

Datele experimentale, reologice și de cedare in vitro, au confirmat intercomparabilitatea, însă trebuie menționat că cele două tipuri de formulări farmaceutice selectate sunt reprezentative doar pentru anumite compoziții sau microstructuri. Produsele anhidre lipofile sau hidrofile generează profile atipice, caz în care principiile de dezvoltare a testelor, inclusiv alegerea unui anumit model de celulă, vor fi diferite.

Bibliografie

Ciolan DF, Lupuleasa D, Stanescu AA, Miron DS, Rădulescu FȘ. Influence of the receptor media composition on the in-vitro release rate of ketoconazole from topical semisolid dosage forms. International Symposium on Scientific and Regulatory Advances in Complex Drugs, Budapesta, Ungaria, 27-28 octombrie 2014. Poster P-8, rezumat publicat în volumul manifestării (OOK-Press Ltd., Veszprem), 52, ISBN: 978-615-5270-13-0.

Ciolan DF, Mînea A, Andrieș AA, Nicoară AC, Rădulescu FS, Miron DS. The influence of compendial cells design and experimental setup on the in-vitro similarity of ketoconazole topical creams. Farmacia 2015;63(6):865-871.

Ciolan DF, Mînea A, Lupuleasa D, Stănescu AA, Nicoară AC, Rădulescu FS, Miron DS. Correlated evaluations of in vitro release profiles and structural parameters for topical semisolid dosage forms containing metronidazole. Studia Universitatis Vasile Goldis Arad, Seria Stiintele Vieții 2015;25(3):145-150.

Lista articolelor publicate în cadrul cercetărilor doctorale în reviste de specialitate indexate în baze de date internaționale:

Ciolan DF, Mînea A, Andrieș AA, Nicoară AC, Rădulescu FS, Miron DS. The influence of compendial cells design and experimental setup on the in-vitro similarity of ketoconazole topical creams. Farmacia 2015, RG Journal impact 0.86;63(6):865-871.

http://www.revistafarmacia.ro/201506/art-13-Ciolan_Dragos_865-871.pdf

Ciolan DF, Mînea A, Lupuleasa D, Stănescu AA, Nicoară AC, Rădulescu FS, Miron DS. Correlated evaluations of in vitro release profiles and structural parameters for topical semisolid dosage forms containing metronidazole. Studia Universitatis Vasile Goldis Arad, Seria Stiintele Vieții - Ranking and Indexing :Index Copernicus Value : 5.45 , CNCSIS B+ (code 820) -2015;25(3):145-150.

<http://www.studiauniversitatis.ro/vol-25-iss-3-2015/1103-university-of-medicine-and-pharmacy-carol-davila-bucharest-faculty-of-pharmacy-no6-traian-vuia-st-020956-bucharest-romania-1department-of-pharmaceutical-chemistry-2department-of-pharmaceutical-technology-and-biopharmaceutics-3department-of-dr.html>

Lista lucrărilor elaborate în cadrul cercetărilor doctorale prezentate la manifestări științifice organizate de asociații profesionale naționale și internaționale:

Ciolan DF, Lupuleasa D, Stanescu AA, Miron DS, Rădulescu FȘ. Influence of the receptor media composition on the in-vitro release rate of ketoconazole from topical semisolid dosage forms. International Symposium on Scientific and Regulatory Advances in Complex Drugs, Budapesta, Ungaria, 27-28 octombrie 2014. Poster P-8, rezumat publicat în volumul manifestării (OOK-Press Ltd., Veszprem), 52, ISBN: 978-615-5270-13-0.

Rădulescu FȘ, **Ciolan DF**, Mînea A, Lupuleasa D, Miron DS. Evaluation of concentration - in-vitro release rate relationship for miconazole nitrate creams. International Symposium on Scientific and Regulatory Advances in Complex Drugs, Budapesta, Ungaria, 27-28 octombrie 2014. Poster P-4, rezumat publicat în volumul manifestării (OOK-Press Ltd., Veszprem), 48, ISBN: 978-615-5270-13-0.