



Artículo original

Modelo de correlación farmacocinético *in vitro-in vivo* para el aseguramiento de la calidad de medicamentos antirretrovirales

In vitro-in vivo Pharmacokinetic correlation model for quality assurance of antiretroviral drugs

Ricardo Rojas Gómez, Piedad Restrepo Valencia

Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM), Cali, Colombia.

Rojas GR, Restrepo VP. *In vitro-in vivo* Pharmacokinetic correlation model for quality assurance of antiretroviral drugs. *Colomb Med.* 2015; 46(3): 109-16.

© 2015 Universidad del Valle. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution License, que permite el uso ilimitado, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que el autor original y la fuente se acrediten

Historia

Recibido: 09 julio 2014
Revisado: 06 marzo 2015
Aceptado: 20 agosto 2015

Palabras clave:

antirretrovirales, permeabilidad, disolución, farmacocinética, biodisponibilidad, correlación.

Keywords:

Antiretrovirals, permeability, dissolution, pharmacokinetics, bioavailability, correlation.

Resumen

Introducción: Los modelos de correlación *In vitro-in vivo* (IVIVC) son parte integral del proceso de investigación y desarrollo de fármacos. La capacidad de predecir con exactitud el perfil *in vivo* a partir de las observaciones *in vitro* tiene diversas aplicaciones durante el desarrollo exitoso de una formulación.

Objetivo: Desarrollar un modelo integral para predecir la absorción *in vivo* de fármacos antirretrovirales con base en estudios de permeabilidad, solubilidad *in vitro* e *in vivo* y demostrar su correlación con la farmacocinética en humanos.

Métodos: Se desarrollaron y validaron las técnicas bioanalíticas para valorar las propiedades biofarmacéuticas de Estavudina, Lamivudina y Zidovudina. Se evaluó las cinéticas de disolución, la permeabilidad en monocapas celulares Caco-2 y la farmacocinética de absorción *in vivo* en conejos y voluntarios sanos.

Resultados: Los valores de ABC (área bajo la curva) acumulados en el sistema de células Caco-2, en la disolución y en el modelo animal, fueron correlacionados con los valores de ABC acumulados en el humano. Con lo anterior se demostró una relación directamente proporcional entre los resultados *in vitro* con respecto a los obtenidos en la fase de absorción tanto en el humano como en el modelo animal.

Conclusiones: Los métodos analíticos y procedimientos aplicados en la IVIVC demostraron las correspondencias directas entre sí, con altos niveles de correlación. Se proponen estos modelos IVIVC como métodos alternativos costo/efectivos para la valoración de las propiedades biofarmacéuticas que determinan la biodisponibilidad, en el desarrollo de productos, en el aseguramiento de la calidad y como pruebas de bioequivalencia en los programas de farmacovigilancia.

Abstract

Introduction: The *in vitro-in vivo* pharmacokinetic correlation models (IVIVC) are a fundamental part of the drug discovery and development process. The ability to accurately predict the *in vivo* pharmacokinetic profile of a drug based on *in vitro* observations can have several applications during a successful development process.

Objective: To develop a comprehensive model to predict the *in vivo* absorption of antiretroviral drugs based on permeability studies, *in vitro* and *in vivo* solubility and demonstrate its correlation with the pharmacokinetic profile in humans.

Methods: Analytical tools to test the biopharmaceutical properties of stavudine, lamivudine and zidovudine were developed. The kinetics of dissolution, permeability in caco-2 cells and pharmacokinetics of absorption in rabbits and healthy volunteers were evaluated.

Results: The cumulative areas under the curve (AUC) obtained in the permeability study with Caco-2 cells, the dissolution study and the pharmacokinetics in rabbits correlated with the cumulative AUC values in humans. These results demonstrated a direct relation between *in vitro* data and absorption, both in humans and in the *in vivo* model.

Conclusions: The analytical methods and procedures applied to the development of an IVIVC model showed a strong correlation among themselves. These IVIVC models are proposed as alternative and cost/effective methods to evaluate the biopharmaceutical properties that determine the bioavailability of a drug and their application includes the development process, quality assurance, bioequivalence studies and pharmacovigilance.

Autor de correspondencia:

Ricardo Rojas Gómez, Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM), Carrera 125 No 19-225, AA 5390, Cali, Colombia. Correo electrónico: rrojas@cideim.org.co.

Introducción

El uso de modelos de correlación *in vitro-in vivo* (IVIVC) es parte integral de los procesos de investigación y desarrollo de fármacos. Estos modelos pueden predecir con exactitud el comportamiento *in vivo* de los medicamentos a partir de observaciones *in vitro*, y sus aplicaciones son útiles en áreas que incluyen: la valoración de las propiedades farmacocinéticas, el aseguramiento de la calidad en programas de farmacovigilancia y el control de calidad durante el desarrollo industrial de una formulación. La correlación se define, según la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU. (FDA), como el modelo matemático que describe la dependencia entre el comportamiento *in vitro* de una propiedad o cualidad y la medida de la intensidad de una respuesta *in vivo*, tal que ésta sea relevante para el fármaco en estudio. La propiedad de los medicamentos sólidos, comúnmente aplicada *in vitro* en investigación y desarrollo y pruebas de calidad, es la tasa de disolución o de liberación del fármaco de la forma farmacéutica; mientras que la respuesta *in vivo* a correlacionar es la concentración o cantidad absorbida que llega al plasma en la unidad de tiempo¹. De esta manera, con una IVIVC con base en pruebas de disolución, es posible predecir el comportamiento *in vivo* de algunos fármacos.

Si bien se reconoce que existen correlaciones entre la disolución *in vitro* y la absorción *in vivo*, se ha avanzado poco en el desarrollo de modelos integrales que comprendan la valoración de propiedades complementarias, de tal forma que mejoren la capacidad predictiva de los métodos *in vitro*. Lo anterior es necesario si se tienen en cuenta los factores físicos, químicos y biológicos que contribuyen tanto al proceso de disolución como al de absorción. Entre los factores se señalan las propiedades fisicoquímicas del fármaco, las propiedades biofarmacéuticas del medicamento y las características fisiológicas de las vías de absorción en el paciente.

La solubilidad a su vez, está determinada por factores como el estado de ionización del fármaco, que cualifica diferentes propiedades de los compuestos, según las diferentes condiciones de pH en el sitio de disolución. Esto es altamente relevante porque el cuerpo humano contiene gradientes de pH, especialmente en el tracto gastrointestinal (GI), que dan lugar a diferentes perfiles de absorción dependientes del pH *in vivo*².

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un modelo integral para predecir el comportamiento farmacocinético *in vivo* en la fase de absorción de fármacos antirretrovirales, con base en mediciones de permeabilidad y solubilidad *in vitro*. Lo anterior se enmarca en los avances de las ciencias farmacéuticas, la industria y la regulación sanitaria, que han consolidado la valoración de la calidad de los medicamentos por medio de ensayos de biodisponibilidad *in vivo* en sujetos humanos. Sin embargo, los análisis de racionalidad en costos económicos y éticos, que obligan al desarrollo de alternativas sustitutas a la inclusión de humanos, entre ellas las que tienen en cuenta propiedades fisicoquímicas y de permeabilidad de las moléculas, de acuerdo con la clasificación Biofarmacéutica (BCS)³.

Materiales y Métodos

Reactivos

Los estándares y los productos de Estavudina (d4T), Lamivudina

(3TC) y Zidovudina (AZT) fueron proporcionados por Humax Pharmaceutical (Medellin, Colombia). Dulbecco's modified Eagle's médium (DMEM) con L-Glutamina, aminoácidos no esenciales (NEA 100X), solución de Hanks (HBSS), Ácido N-(2-Hidroxiethyl)-piperazina-N'-(2-etanosulfónico), sal de sodio (HEPES), Bicarbonato de Sodio y Penicilina/Estreptomina 100X fueron compradas a Sigma-Aldrich y el Suero Fetal Bovino a Gibco. Los reactivos se prepararon según las indicaciones del fabricante.

Disolución

Las cinéticas de disolución *in vitro* fueron realizadas siguiendo los lineamientos de la Farmacopea de los Estados Unidos en el disolutor Pharma Alliance Group, Modelo TDT- 08L, con el método de paletas, a una rotación de 50 rpm, en 900 mL agua desgasificada, a una temperatura de 37° C ± 0.5, durante 10, 20, 30, 45 y 60 min.

Cultivo de células Caco-2

Las células Caco-2 (HTB-37) fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC). Se usaron células entre los pases 30 y 50 en medio DMEM con alto contenido de glucosa (4.5 g/L) y suplementado con L-Glutamina, 10% de suero fetal bovino, 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de penicilina/estreptomina. Para los ensayos de permeabilidad se sembraron a una densidad de 6x10⁴ células/cm² en insertos *transwell* con membrana de policarbonato (0.4 µm, 1.12 cm²; Corning Costar). La integridad de las monocapas se evaluó mediante la medición de la Resistencia Eléctrica Transepitelial (TEER), al comienzo y al final de cada ensayo. Solo monocapas con valores de TEER mayores a 200 Ω/cm² fueron usadas.

El coeficiente de permeabilidad aparente (*P_{app}*) fue determinado de la cantidad de fármaco transportado por unidad de tiempo y fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$P_{app} = \left(\frac{\Delta Q}{\Delta t} \right) / (A \times C_0)$$

Donde ($\Delta Q/\Delta t$) es la concentración acumulada en el compartimento receptor (µmol/seg) versus el delta de tiempo, A: es la superficie del inserto (cm²) y C₀: es la concentración inicial en el compartimento donador (µM). La integridad del sistema fue evaluado por el coeficiente de permeabilidad (P). El coeficiente de Permeabilidad aparente (*P_{app}*) esta asociado al valor del Coeficiente de permeabilidad.

$$P = \left(\frac{\Delta Q}{\Delta t} \right) \times \left(\frac{\text{Concentración del compartimento receptor}}{\text{Área de inserto}} \right)$$

La determinación de integralidad se concluye cuando se comparan los valores promedios obtenidos experimentalmente con estándares definidos para la molécula en estudio. El flujo inicial del fármaco (*J*) se determinó de la pendiente de la regresión

lineal de la cantidad de fármaco transportado versus el tiempo y la concentración inicial en el compartimento donador.

Farmacocinética en animales

Todos los protocolos y procedimientos fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética para Investigación en Animales de CIDEIM, en ellos se constataron los compromisos y lineamientos internacionales sobre tener el mayor respeto y cuidado, el reconocimiento de su valor intrínseco como especie viva, así como la profunda reflexión sobre las posibilidades de remplazo, la reducción y el refinamiento de las técnicas y procedimientos. Se siguieron todos los lineamientos de las leyes de Colombia en el uso de animales de laboratorio⁴⁻⁶. En cada estudio farmacocinético se incluyeron diez conejos New Zeland por grupo, con pesos entre 2.5-3.2 kg. Los conejos fueron mantenidos en el bioterio bajo todas las cuidados y condiciones estándares para el manejo de animales (20-25° C; 30-70% humedad relativa, ciclo natural de Luz/Oscuridad), con acceso a agua y comida *ad libitum* hasta 2 h antes del estudio y después de una hora de administrar el medicamento por vía oral en una suspensión acuosa. Cada grupo recibió una sola dosis de Estavudina 8.9 mg/kg, Lamivudina 20.8 mg/kg o Zidovudina 41.7 mg/kg. Se tomaron muestras de 2 mL de sangre de la vena marginal de la oreja, antes de la administración del medicamento y durante 6 h después para Lamivudina y Zidovudina, en los intervalos: 0.0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, y 6.0 h. Para Estavudina se colectaron muestras durante 3 h después de la administración, en los intervalos: 0.0, 0.08, 0.17, 0.25, 0.33, 0.50, 0.75, 1.0, 2.0 y 3.0 h. Las muestras se centrifugaron a 1,500 rpm durante 20 min y el plasma se analizó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para la cuantificación de cada principio activo (PA).

Farmacocinética en humanos

El estudio y los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética Institucional del Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Medicas (CIDEIM), de acuerdo con la Declaración de Helsinki (Octubre 2008), los lineamientos éticos internacionales para investigación en sujetos humanos del Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) y el Ministerio de Protección Social Colombiano Resolución 2378 de 2008. EL diseño del estudio fue abierto, aleatorizado, de una sola vía, un solo periodo y una sola dosis. Se seleccionaron participantes de sexo masculino, con edad entre 18-35 años, dentro de $\pm 15\%$ de su peso corporal ideal, normales al examen físico y con exámenes de laboratorio clínico dentro de los rangos establecidos (bioquímicos, hematológicos, función hepática, función renal, función tiroidea y uroanálisis). A cada participante se le explico los riesgos del estudio y cada uno proporcionó de manera voluntaria el consentimiento informado escrito. Diez voluntarios recibieron una sola cápsula de Estavudina 40 mg (Humax Pharmaceutical) y el segundo

grupo de 9 voluntarios recibieron una sola tableta combinada de Lamivudina 150 mg/Zidovudina 300 mg (Humax Pharmaceutical) con 240 mL de agua. Se colectaron muestras de sangre (8 mL) antes de la administración del medicamento y durante 12 h después de su administración, a partir de un catéter mantenido con solución salina. Los intervalos de muestreo correspondieron: 0.0, 0.17, 0.33, 0.50, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 6.0, 9.0 y 12 h.

Análisis de las muestras

Las muestras de plasma humano y de conejo fueron analizadas en un UPLC equipado con detector UV con arreglo de diodos (LaChrome Ultra, Hitachi). Se uso una columna Chromolith® Performance RP-18 column (100x4.6 mm, Merck), una fase móvil de buffer Acetato de Amonio 10 mM y acetonitrilo (96:4, v/v, pH 6.0) a una temperatura de 35° C y un flujo de 1.2 mL/min. Las proteínas plasmáticas fueron precipitadas con metanol y cada procedimiento aplicado fue validado de acuerdo a los lineamientos de la FDA⁷.

Análisis estadístico

Los parámetros farmacocinéticos fueron calculados usando métodos no compartimentales, con transformación logarítmica de los datos de concentración. La vida media de eliminación ($t_{1/2}$) fue estimada de la regresión lineal de la curva de concentración (log) versus tiempo. El área bajo la curva (ABC) de concentración plasmática en el tiempo se determinó por el metodo trapezoidal con el software "PKSolutions Pharmacokinetics Noncompartmental Data Analysis"[™] (Summit Research Services, Windows 2.0.6 Excel 2002 Edition®). Para la validación de los métodos bioanalíticos y los cálculos de linealidad se utilizó el software "Statgraphics Plus 4.1. Professional Version"[™] (Statistical Graphics Corp).

Resultados

Desarrollo y validación de métodos bioanalíticos

Los métodos para la determinación y cuantificación de Estavudina, Lamivudina y Zidovudina fueron desarrollados en plasma para los estudios farmacocinéticos y en HBSS para los ensayos de permeabilidad. Para la validación se realizaron curvas de calibración en cada una de las matrices, donde se prepararon diez estándares de diferente concentración (cinco réplicas por cada concentración), diluyendo una solución stock en HBSS o plasma libre de fármacos. La linealidad fue evaluada en el rango de 0.25 a 6.0 $\mu\text{g/mL}$ para d4T y 3TC, y 0.25 a 8.0 $\mu\text{g/mL}$ para AZT. Los estándares preparados en HBSS y en plasma fueron estables por mas de 90 días a $-75 \pm 5^\circ \text{C}$. Todos los métodos cumplieron con los criterios de: linealidad ($r^2 \geq 0.8$), precisión (CV <15%), exactitud (CV <15%), recuperación (>80%), limite inferior de detección y cuantificación (Tabla 1).

Tabla 1. Validación de métodos bioanalíticos

Parámetro	Solución salina de Hanks			Plasma humano		
	Estavudina	Lamivudina	Zidovudina	Estavudina	Lamivudina	Zidovudina
Linealidad	$y = 1.061x + 0.019$ $R^2 = 0.9990$	$y = 0.971x - 0.025$ $R^2 = 0.999$	$y = 0.814x + 0.085$ $R^2 = 0.9901$	$y = 1.055x - 0.022$ $R^2 = 0.9958$	$y = 0.942x - 0.055$ $R^2 = 0.995$	$y = 0.567x - 0.016$ $R^2 = 0.9993$
Precisión (Coeficiente de variación %)	2.1	1.9	2.4	2.8	3.5	1.5
Exactitud (Error relativo %)	0.3	0.1	1.3	4.5	0.2	0.2
Bajo límite de detección ($\mu\text{g/mL}$)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Bajo límite de cuantificación ($\mu\text{g/mL}$)	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1	0.0
recuperación (%)	99.1	99.9	97.1	95.6	99.2	99.7

Tabla 2. Perfiles de disolución y porcentajes de acumulación en Caco-2 en conejos y en humanos

		Tiempo (h)					
		0.17	0.25	0.33	0.50	0.75	1.00
Zidovudina	Disolución	83.555	86.924	89.397	93.002	96.752	99.504
	Acumulación Caco-2	0.955	2.102	3.627	7.734	16.392	27.889
	ABC acumulada Conejo	2.370	5.040	8.220	15.240	26.070	36.190
	ABC acumulada humana	2.700	5.800	9.550	18.070	31.480	44.020
Lamivudina	Disolución	94.831	96.167	97.126	98.495	99.882	100.878
	Acumulación Caco-2	0.744	1.666	2.942	6.544	14.534	25.595
	ABC acumulada Conejo	0.750	1.640	2.820	5.860	11.640	18.330
	ABC acumulada humana	0.170	0.380	0.670	1.460	3.120	5.270
Stavudina	Disolución	92.362	92.726	92.985	93.352	93.720	93.982
	Acumula Caco-2	0.760	1.699	2.995	6.637	14.683	25.782
	ABC acumulada Conejo	3.640	7.570	11.890	20.660	32.870	43.400
	ABC acumulada humana	2.230	4.720	7.630	13.940	23.530	32.480

Perfil de disolución

Las cinéticas de disolución se realizaron según parámetros farmacopeicos a los 10, 15, 20, 30, 45, 60 min en 12 ensayos independientes. El valor promedio fue usado para calcular la regresión lineal logarítmica y el modelo matemáticos de los perfiles de disolución, donde *y* es el porcentaje de fármaco disuelto y *x* es el tiempo:

Estavudina: $y = 0.0097\ln(x) + 3.6246$
 Lamivudina: $y = 0.0345\ln(x) + 5.0272$
 Zidovudina: $y = 0.0975\ln(x) + 5.6808$

Interpolación de periodos similares de acumulación en monocapas de células Caco-2 y de área bajo la curva acumulada (ABC) de la farmacocinética en humanos y conejos fue realizado (Tabla 2).

Ensayos de permeabilidad en Caco-2

Se estandarizaron los parámetros para los ensayos de permeabilidad en monocapas celulares. Adicional a la TEER para evaluar la integridad de las monocapas, se utilizó dos marcadores de permeabilidad, Metoprolol (alta) y Manitol (baja), para transporte transcelular y paracelular respectivamente. La *Papp* de metoprolol fue de 47.2×10^{-6} cm/seg (SD $\pm 5.5 \times 10^{-6}$, n= 5) y para manitol no fue posible determinar su *Papp* porque las concentraciones en el compartimento receptor no fueron detectables.

La determinación de los cambios de concentración en el compartimento receptor a 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos en diez ensayos independientes nos permitió evaluar los indicadores de difusión (Tabla 3). Los datos obtenidos de las cinéticas de orden 1 fueron ajustados por el modelo matemático de mínimos cuadrados, con coeficientes de correlación >0.99, donde *y* es la concentración (µg/mL) y *x* es el tiempo (h):

Estavudina: $y = 0.9548\ln(x) + 2.1457$
 Lamivudina: $y = 0.9655\ln(x) - 0.0574$
 Zidovudina: $y = 0.8391\ln(x) + 1.6946$

Estas ecuaciones fueron aplicadas a la correlación de los datos con respecto a la disolución en una hora y a la farmacocinética en humanos y en conejos.

Ensayos farmacocinéticos en conejos

Las dosis administradas a los animales (d4T 0.60 mg/Kg, 3TC 2.13

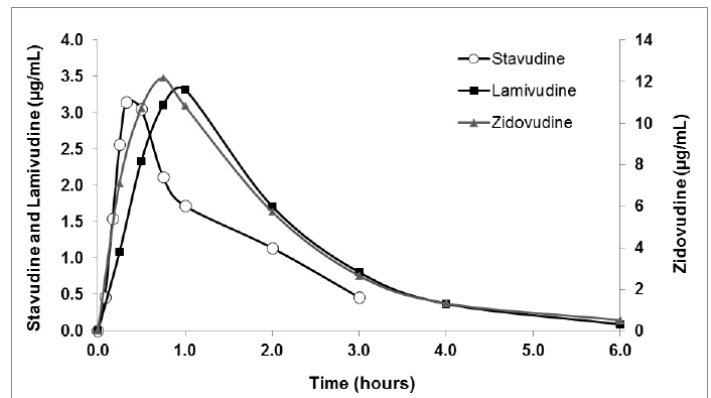


Figura 1. Farmacocinética en el modelo animal.

mg/Kg y AZT 4.14 mg/Kg) fueron normalizadas con respecto a las dosis de los voluntarios, para la proporcionalidad entre ellos (Conejo/Humano). Estos factores fueron: d4T 14, 3TC 9.78 y AZT 10.06. Los resultados de concentración fueron usados para evaluar la fase de absorción y de eliminación en la curva del logaritmo de concentración versus el tiempo, donde *y* es la concentración del analito en el plasma y *x* es el periodo de muestreo, en la fase de eliminación ($R^2 > 0.97$), entonces:

Estavudina: $y = -0.6906x + 1.3588$
 Zidovudina: $y = -0.6206x + 2.9383$
 Lamivudina: $y = -0.7271x + 4.2558$

Los datos simulados obtenidos con estas ecuaciones, ajustados por el factor de dosis en humanos, fueron usados en los análisis farmacocinéticos no compartimentales para evaluar las áreas bajo las curvas parciales y acumuladas (ABC_{0-t} , ABC_{Acum}) de acuerdo con el método residual de Wagner-Nelson (Fig. 1), calculada por:

$$C_p = \frac{F \cdot Dosis \cdot K_A}{V_d \cdot (K_a - K_e)} [e^{-K_e \cdot t} - e^{-K_a \cdot t}]$$

Expresada como: $C_p = I(e^{-k_e \cdot t} - e^{-k_a \cdot t})$

Los principales parámetros farmacocinéticos se describen en la Tabla 4. La concentración plasmática de los tres antirretrovirales alcanzó su valor máximo rápidamente y después disminuyó para alcanzar los niveles basales a las 6 h post-administración. Estos resultados demuestran la rápida absorción de los tres productos y

Table 3. Parámetros de difusión en monocapas celulares Caco-2

Parámetro*	Unidades	Estavudina	Lamivudina	Zidovudina
$P_{app} \times 10^{-6}$	cm/sec	6.4 ± 1.8	7.0 ± 2.0	20.3 ± 4.7
Flujo (J)	µg/cm ² /min	0.081 ± 0.003	0.041 ± 0.005	0.063 ± 0.004

*Promedio ± DS (n= 10)

P_{app} = Coeficiente de Permeabilidad aparente

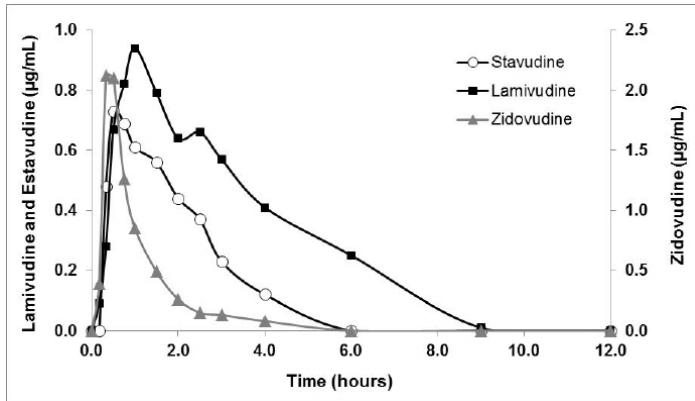


Figura 2. farmacocinética en humanos.

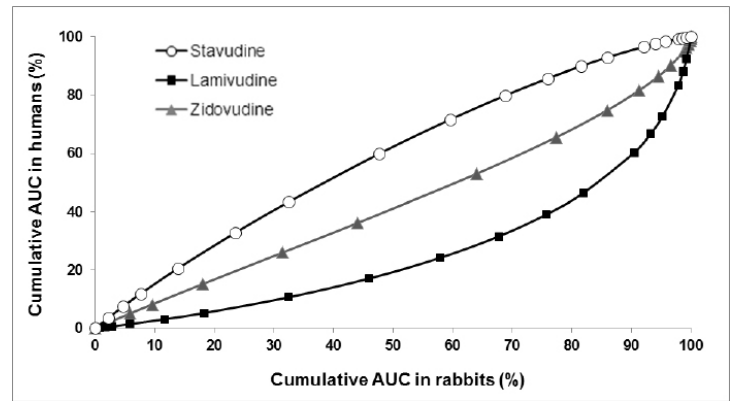


Figura 3. Correlación del área bajo la curva en humanos vs el modelo animal.

la alta permeabilidad de los tres principios activos. AZT alcanzó la mayor biodisponibilidad de los tres antirretrovirales.

Farmacocinética en humanos

Los perfiles farmacocinéticos fueron el principal parámetro derivado como referencia para las correlaciones *in vitro-in vivo* (Tabla 4). El perfil plasmático de concentración versus tiempo después de la administración de una dosis oral de Estavudina (40 mg) o Lamivudina (150 mg)/ Zidovudina (300 mg) se muestra en la Figura 2.

La regresión lineal del logaritmo de la concentración plasmática en el tiempo, proporcionó el modelo matemático para la fase de eliminación ($R^2 > 0.97$).

Estavudina: $y = -0.5046x + 0.0649$

Zidovudina: $y = -0.9678x + 0.9018$

Lamivudina: $y = -0.2595x + 2.4725$

Los tres antirretrovirales evaluados fueron rápidamente absorbidos después de la administración oral (Tabla 4).

Correlaciones *in vitro-in vivo*

Disolución versus Permeabilidad. Se compararon los porcentajes de cambios en concentración entre cero y una hora (tiempo máximo de disolución) y los cambios de concentración en el compartimento receptor de las monocapas celulares de los ensayos de permeabilidad (Tabla 2). Los modelos matemáticos de regresión lineal calculados mostraron que los datos de disolución son idóneos para predecir la permeabilidad por difusión ($R^2 > 0.80$).

Estavudina: $y = 14.581x - 1,350, R^2 = 0.8368$

Lamivudina: $y = 3.8844x - 371.6, R^2 = 0.8401$

Zidovudina: $y = 1.6163x - 138.14, R^2 = 0.8655$

Donde y son los porcentajes de ABC acumulados en Caco-2 y x es el porcentaje de disolución. Estas funciones pueden ser implementadas para predecir la calidad de los medicamentos en terminos de la permeabilidad de las materias primas de diferentes orígenes durante el proceso de manufactura.

Correlaciones *in vivo-in vivo*:

Conejo versus Humanos. Se correlacionaron las áreas bajo la curva acumuladas y se aplicó un análisis de regresión estadística

Table 4. Parámetros farmacocinéticos en el modelo animal y en el humano

Producto		Farmacocinética conejo			Farmacocinética humana		
		Zidovudina	Lamivudina	Estavudina	Zidovudina	Lamivudina	Estavudina
C_{max}	µg/mL	12.17	3.31	3.15	2.12	0.94	0.73
T_{max}	h	0.75	1.00	0.33	0.33	1.00	0.50
$T_{1/2}$	h	1.12	0.95	1.00	0.72	2.68	1.37
$ABC_{(0-t)}$	h*µg/mL	25.17	6.87	4.38	2.16	3.51	1.67
$ABC_{(0-\infty)}$	h*µg/mL	26.00	6.99	4.90	2.16	3.51	1.67
$ABMC_{(0-t)}$	µg-h*h/mL	41.34	11.62	4.97	3.02	10.41	3.02
$ABMC_{(0-\infty)}$	µg-h*h/mL	47.71	12.53	7.10	3.02	10.41	3.02

C_{max} = máxima concentración

T_{max} = Tiempo requerido para alcanzar la concentración máxima

ABC = Area bajo la curva en el tiempo

ABMC = Area bajo el primer momento de la curva

de mínimos cuadrados (Fig. 3). Se observó una alta correlación entre el perfil farmacocinético en humanos y el modelo animal (Estavudina $R^2= 0.987$, Lamivudina $R^2= 0.885$ y Zidovudina $R^2= 0.989$). La ABC_{0-t} para Zidovudina en ambas especies mantuvo la proporcionalidad con respecto a la dosis. Sin embargo, para Lamivudina aunque la razón de dosis Conejo/Humano fue de diez veces, la ABC_{0-t} solo excedió dos veces el valor en humanos. Para Estavudina, la razón de la dosis fue 15 veces mayor en conejos con respecto al humano, pero solo excedió dos veces y media la ABC_{0-t} en humanos.

Los valores de C_{max} expresaron las mayores diferencias interespecie con relación a la fracción absorbida, por lo cual no se recomienda el uso de este parámetro para predecir el comportamiento de los fármacos. El tiempo para alcanzar la máxima concentración (T_{max}) de Zidovudina fue dos veces más lento en humanos que en conejos (0.75 h and 0.33 h, respectivamente), mientras que para Lamivudina y Estavudina los valores fueron similares (Tabla 4). Por lo anterior, para estos dos fármacos el T_{max} en el modelo conejo estuvo relacionado directamente con el resultado esperado en humano. La comparación de los resultados *in vivo*, en conejo y humano con base en ABC_{0-t} , se basó en los perfiles plasmáticos y los modelos de eliminación en la curva del logaritmo de concentración versus tiempo para los cambios simulados en los mismos períodos (Método Wagner-Nelson).

Correlación de porcentajes acumulados de ABC en humanos versus conejos

Los modelos matemáticos de la correlación lineal y los factores correspondientes (R^2) a la recta de regresión por mínimos cuadrados fueron:

$$\text{Zidovudina: } y = 0.9838x - 3.4354, R^2 = 0.988$$

$$\text{Lamivudina: } y = 0.8562x - 9.3888, R^2 = 0.885$$

$$\text{Estavudina: } y = 0.9709x + 7.6027, R^2 = 0.987$$

Los valores de x representan el ABC acumulada en conejos interpolados para y o ABC acumulado en humanos en el mismo periodo para dosis equivalentes. Los factores de correlación demostraron la capacidad de la especie conejo para predecir la biodisponibilidad en humanos, por la cantidad de fármaco absorbido y acumulado en el tiempo, con una probabilidad cercana o mayor al 90%. Estos modelos matemáticos superan los análisis de variabilidad biológica y diferencias inter-especies,

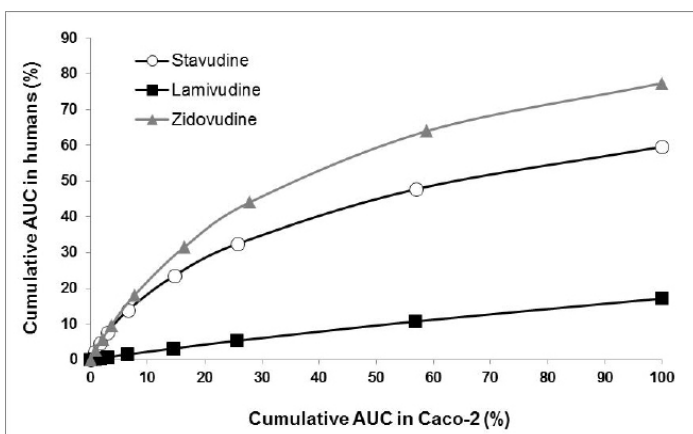


Figura 4. Correlación de la permeabilidad *in vitro* vs absorción *in vivo*.

porque cada sujeto respondió de manera integral conjugando las propiedades fisiológicas del animal y del sujeto humano bajo las condiciones del ensayo.

Correlaciones *in vitro-in vivo*.

Disolución versus ABC_{0-t} Humanos. Se compararon los perfiles de disolución y la farmacocinética en animales y humanos (Tabla 2). Se encontró una correlación directa y exponencial entre el porcentaje del fármaco disuelto *in vitro* y la ABC acumulada *in vivo* en el humano ($R^2 > 0.99$).

$$\text{Estavudina: } y = 1.4842e^{0.5376x}$$

$$\text{Lamivudina: } y = 0.0902e^{0.6906x}$$

$$\text{Zidovudina: } y = 1.7444e^{0.5619x}$$

En estas ecuaciones x representa los valores de porcentaje de disolución y el ABC *in vivo* proyectada para el mismo periodo de tiempo. Los datos farmacocinéticos en el modelo animal mostraron resultados igualmente satisfactorios con modelos exponenciales y factores de correlación mayores a 0.98. La relación exponencial directa entre el porcentaje de disolución y la cantidad de fármaco disponible en el plasma sanguíneo ($R^2 > 0.98$), fue útil para prever la eficacia de los procesos de absorción a partir de los datos del porcentaje de disolución *in vitro*.

Correlación *in vitro-in vivo*

Permeabilidad versus ABC en Humanos. Los valores de ABC acumulados en el sistema Caco-2 fueron correlacionados con los valores de ABC *in vivo* en las dos primeras horas, tiempo durante el cual se realizaron los ensayos de permeabilidad. Se encontró una relación directamente proporcional para Lamivudina, mientras que para Estavudina y Zidovudina fue logarítmica (Fig. 4). Las siguientes funciones expresan la relación directa entre el porcentaje de transferencia en Caco-2 y el Porcentaje de ABC Acumulada post-administración.

$$\text{Estavudina: } y = 11.820\ln(x) - 2.3697 \quad R^2 = 0.9305$$

$$\text{Zidovudina: } y = 16.488\ln(x) - 7.2008 \quad R^2 = 0.9332$$

$$\text{Lamivudina: } y = 0.172(x) + 0.3678 \quad R^2 = 0.9961$$

Los resultados de las comparaciones en el modelo animal fueron igualmente satisfactorios con funciones exponenciales y factores de correlación mayores a 0.90.

Regresión lineal múltiple

Farmacocinética en humanos vs % disolución y permeabilidad en Caco-2. La interpretación final de las relaciones de los resultados *in vitro* (% de disolución y la cantidad difundida a través de monocapas Caco-2), con respecto a la cantidad de fármaco acumulado en el tiempo *in vivo* en humanos, fue realizada por regresión lineal múltiple en el intervalo de confianza de 95% ($p < 0.05$), para las siguientes funciones:

Variables Independientes: % Disolución y ABC Acumulada en Caco-2.

Variable dependiente: ABC Acumulada en humanos en la primera hora post-absorción.

$$\text{Zidovudina: } R^2 = 0.991$$

$$ABC_{AcuHum} = 2.681 + (0.0149 * \% \text{ de Disolución}) + (1.170 * ABC_{AcuCaco-2})$$

Lamivudina: $R^2= 0.999$

$$ABC_{AcuHum} = -1.713 + (0.0185\% \text{ Disolución}) + (0.202 * ABC_{AcuCaco-2})$$

Estavudina: $R^2= 0.986$

$$ABC_{AcuHum} = 2.255 + (0.0232\% \text{ Disolución}) + (1.488 * ABC_{AcuCaco-2})$$

Resultados similares con correlaciones superiores a 0.97 se obtuvieron de la regresión múltiple para las mismas variables en modelo animal.

Discusión

Las normas de regulación sanitaria exigen el aseguramiento de la calidad de los medicamentos en ensayos de biodisponibilidad y bioequivalencia *in vivo* en sujetos humanos adultos sanos. Este estudio demuestra la validez de aplicar pruebas sustitutas *in vitro*, para disminuir los costos y los riesgos éticos por incluir humanos en investigación, teniendo en cuenta bases científicas razonables. Las pruebas se apoyan en las propiedades de disolución y permeabilidad de los principios activos, según la Clasificación Biofarmacéutica (BCS)³. Zidovudina, Lamivudina y Estavudina son sustancias Tipo I, altamente solubles en agua y altamente permeables en las pruebas de absorción⁸. Los fármacos Tipo I en productos orales de liberación inmediata, pueden ser exencionados de los estudios en sujetos humanos, sin embargo actualmente la garantía de calidad está dada al demostrar biodisponibilidad y/o Bioequivalencia en ensayos *in vivo*

Valoración fisicoquímica y ensayo de disolución

Los productos analizados cumplieron las especificaciones de calidad para la valoración de contenido, la uniformidad de dosis y los perfiles de disolución, de acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP34, NF29, 2011) y documentos afines⁹⁻¹³. En menos de 20 min fue disuelto el 99.0 % de Lamivudina, el 91.2% de Zidovudina y el 93.5% de Estavudina. La solubilidad ratificó la recomendación de exención de estudios de bioequivalencia *in vivo* para productos de liberación inmediata como Lamivudina, Zidovudina y/o Estavudina^{14,15}. El perfil de disolución confirmó que el 81.8% de la Zidovudina fue liberada de las tabletas en los primeros 10 min y el 93.4% de la Lamivudina. Las cápsulas de Estavudina liberaron más del 90.0% del principio activo en los primeros 15 min.

Ensayos de permeabilidad en Caco-2

Los resultados de alta y baja permeabilidad fueron referidos a los estándares de Metoprolol y Manitol respectivamente, que estuvieron en concordancia con otros estudios y con los lineamientos de la FDA^{16,17}, lo cual confirma la idoneidad de nuestro sistema *in vitro* para discriminar entre compuestos de alta y baja permeabilidad. Los resultados obtenidos para Estavudina y Lamivudina fueron muy similares y encajan bajo la categoría de alta permeabilidad. La permeabilidad de Zidovudina fue tres veces mayor que Estavudina y Lamivudina, lo cual está relacionado con sus propiedades físicoquímicas de lipofilia. Esta metodología cumple con los requisitos de las guías de ensayos *in vitro* para la evaluación de las propiedades de solubilidad y permeabilidad contempladas en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS) y otras publicaciones en la materia¹⁸⁻²¹. La funcionalidad del sistema Caco-2 se comprobó por el coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}), coeficiente de Permeabilidad (P) y coeficiente de Flujo (J).

Estudios farmacocinéticos

El modelo animal conejo demostró ser eficiente para valorar procesos de absorción de acuerdo con las propiedades biológicas y bioquímicas similares a los humanos, y justifica su uso en la investigación pre-clínica^{22,23}. Se siguieron las guías sobre buenas prácticas de laboratorio y todas las relacionadas con el uso de animales en estudios de Biodisponibilidad y Bioequivalencia²⁴⁻²⁹. Los tres fármacos lograron la concentración máxima en plasma en una hora o menos, siendo cerca de 20 min para Estavudina. El tiempo de vida media en conejos para Lamivudina fue 0.95 h, inferior a la experimental en humanos (2.68 h), un poco mayor para Zidovudina 1.12 h (0.72 h) e inferior para Estavudina de 1.0 h (1.37 h).

Los estudios en humanos fueron los referentes de calidad de los medicamentos para medidas de concentración y ABC en 12 horas continuas³⁰⁻³³. Los parámetros evaluados fueron: concentración máxima del principio activo en plasma ($C_{m\acute{a}x}$), Área Bajo la curva de Concentración en el tiempo (ABC_{0-t}) y tiempo para concentración máxima ($T_{m\acute{a}x}$).

Este estudio demostró la biodisponibilidad *in vivo* de los productos Zidovudina 300 mg/Lamivudina 150 mg tabletas y Estavudina 40 mg cápsulas de Humax Pharmaceutical S.A, y el cumplimiento de los estándares de calidad de acuerdo a las propiedades de disolución, contenido y demás atributos fisicoquímicos prescritos para estas formas farmacéuticas. Se comprobó la capacidad de difusión y permeabilidad de los principios activos a través de las monocapas celulares, en proporción directa con la farmacocinética de absorción *in vivo* en el modelo animal y en voluntarios adultos sanos. Los métodos analíticos y procedimientos validados aplicados en ensayos *in vitro* demostraron las correspondencias directas entre los resultados obtenidos y los estudios farmacocinéticos *in vivo*, con coeficientes de correlación mayores de 0.85.

Conclusión

En este estudio se logró el propósito de implementar metodologías analíticas, que habitualmente se aplican en la investigación y desarrollo de nuevos fármacos, para medir propiedades físicas y biológicas, con resultados coherentes con los obtenidos en los estudios de Biodisponibilidad en sujetos humanos, acordes con los principios de una IVIVC. En todas las comparaciones se demostraron valores de regresión lineal por mínimos cuadrados con factores de correlación cercanos o superiores 0.90, en la combinación de comparaciones como:

in vitro–*in vitro*: Permeabilidad - Disolución

in vitro–*in vivo*: Disolución – Farmacocinética

in vitro–*in vivo*: Permeabilidad – Farmacocinética

in vivo–*in vivo*: Relación Farmacocinética modelo Animal – Humano

Los resultados de este estudio sustentan la propuesta de revisar los requerimientos regulatorios vigentes en Colombia, relacionados con los estudios *in vivo* como pruebas de bioequivalencia para productos de liberación inmediata con principios activos clasificados como BCS-I, específicamente antiretrovirales nucleosídicos inhibidores de Transcriptasa Reversa.

Se propone, fomentar la capacidad de la industria farmacéutica para estandarizar métodos *in vitro* e *in vivo* en conejos como modelo animal, complementarios a las pruebas de disolución,

con el fin de validar los resultados entre éstas y para dar la robustez y potencia, indispensable a la garantía de calidad para el comportamiento *in vivo*.

Conflicto de interés:

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Financiación

Esta investigación fue financiada por subvenciones COLCIENCIAS 2209-327-18510 y el contrato HUMAX Farmacéutica SA 420-2006.

Referencias

- Cook J, Addicks W, Wu YH. Application of the biopharmaceutical classification System in Clinical Drug Development, An Industrial View. *AAPS J.* 2008; 10(2): 306–10.
- Emami J. *In vitro - in vivo* correlation: from theory to applications. *J Pharm Pharm Sci.* 2006; 9(2): 169–89.
- Amidon KS, Langguth P, Lennernas, Yu HL, Amidon GL. Bioequivalence of oral products and the Biopharmaceutics Classification System. *Clin Pharmacol Ther.* 2011; 90(3): 467–70.
- Ministerio de Protección Social. Ley 84 de 1989. Por la cual se adopta el Estatuto Nacional de Protección de los Animales y se crean unas contravenciones y se regula lo referente a su procedimiento y competencia. Bogotá, Colombia.
- Ministerio de Protección Social. Resolución 008430 de 1993. Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Bogotá, Colombia.
- WHO. Regional Publications Eastern Mediterranean Series 30. Practical Guide for Health Researchers. 2004.
- FDA. Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for the industry. Bioanalytical Method Validation. EEUU: 2001.
- Joseph MC, Chi-Yuan W, Leslie ZB. Predicting drug disposition, absorption/ elimination/ transporter interplay and the role of food on drug absorption. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60(6):717–733.
- WHO. Lamivudine. Final text for addition to The International Pharmacopoeia. (QAS/05.123/FINAL) 2006: 5.
- Strauch S, Jantravid E, Dressman JB, Junginger HE, Kopp S, Midha KK, *et al.* Biowaiver monographs for immediate release Solid Oral Dosage Forms: Lamivudine. *J Pharm Sci.* 2011; 100: 2054–63.
- NIH. HHS. National Library of Medicine. Retrovir (zidovudine). Current Medication Information, Daily Med. EEUU: December 2011.
- NIH. HHS. National Library of Medicine . Stavudine capsule (Mylan Pharmaceuticals Inc). Current Medication Information, Daily Med. EEUU: January 2012.
- WHO. Forty-seventh report of the WHO Expert Committee on specifications for pharmaceutical preparations. Technical Report Series 981. WHO; 2013. pp. 202.
- Department of Health and Human Services, FDA . Office of Generic Drugs Division of Bioequivalence Update Frequency: Quarterly. EEUU: January 11 2010.
- Corti G, Maestrelli F, Cirri M, Zerrouk N, Mura P. Development and evaluation of an *in vitro* method for prediction of human drug absorption II. Demonstration of the method suitability. *Eur J Pharm Sci.* 2006; 27(4): 354–62.
- Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001; 46(1-3): 27–43.
- Volpe DA. Application of method suitability for drug permeability classification. *AAPS J.* 2010; 12(4): 670–8.
- Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. EEUU: August . 2000.
- European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Guideline on the investigation of bioequivalence. CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1/ Corr. London: January 2010.
- Polli JE, Abrahamsson BSI, Yu LX, Amidon GL, Baldoni JM, Cook JA, *et al.* Summary workshop report: bioequivalence, biopharmaceutics classification system, and beyond. *AAPS J.* 2008; 10(2): 373–9.
- Kumar KV, Swathi Ki, Mamatha RB, Chandramouli R. Caco-2 Cell Lines in Drug Discovery - An Updated Perspective. *J Basic Clin Pharm.* 2010; 1(2): 63–9.
- National Research Council (US) Committee to Update Science, Medicine, and Animals. Science, Medicine, and Animals. Washington (DC): National Academies Press (US); 2004. Committee to Update Science, Medicine, and Animals.
- Department of Health and Human Services. ACPS Meeting Achieving and demonstrating "Quality by Design" with respect to drug release/ dissolution performance for conventional or immediate release solid oral dosage forms. EEUU: October 2005.
- WHO. Good Laboratory Practices Training Manual. UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Disease (TDR); 2001. pp. 142.
- Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products—General Considerations. 2003.
- WHO Marketing Authorization of Pharmaceutical Products with Special Reference to Multisource (generics) Products. (WHO/DMP/RGS/98.5) 1998.
- The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Evaluation of Medicines for Human Use. 2000.
- Políticas de la Asociación Médica Mundial. Declaración de la Asociación Médica Mundial sobre el Uso de Animales en la Investigación Biomédica. Hong Kong: 1989.
- Tempelman RJ. Experimental design and statistical methods for classical and bioequivalence hypothesis testing with an application to dairy nutrition studies. *J Anim Sci.* 2004; 82 Suppl: E162–72.
- Khandave SS, Onkar SV, Sawant SV, Joshi SS. Evaluation of performance of the truncated area under curve (AUC) as a primary pharmacokinetic parameter in bioequivalence studies. *J Bioequiv Availab.* 2010; 2(4): 77–80.
- Shargel L, Wo-Pong S, Yub CA. Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics. Fifth Edition. United States of America: McGraw Hill; 2005.
- WHO Annex 8 Proposal to waive *in vivo* bioequivalence requirements for the WHO Model List of Essential Medicines immediate release, solid oral dosage forms. 2006: 391–437. Technical Report Series No 937.
- Vacca GCP, Fitzgerald JF, Bermudez JAZ. Definición de medicamento genérico: un fin o un medio. análisis de la regulación en 14 países de la región de las Américas. *Rev Panam Salud Publica.* 2006; 20(5): 314–23.