Rol de las Universidades en el desarrollo de formulaciones huérfanas en pediatría

Prof. Dra. Silvia Lucangioli

CIDEC
Catedra Tecnología Farmacéutica I
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad de Buenos Aires
CONICET

Rol de Universidades

Docencia: UBA-FFyB

Plan de la carrera de Farmacia 2008 (2016)

Tecnología Farmacéutica I (ex Farmacotecnia I)

Materias electivas

- Farmacia Magistral

Practica Profesional Farmacéutica

Cursos de Perfeccionamiento para graduados

Rol de Universidades

CIDEC-FFYB

CENTRO DE INVESTIGACIÓN , DESARROLLO Y CONTROL FARMACÉUTICO

Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Cátedra de Tecnología Farmacéutica I - Departamento de Tecnología Farmacéutica (CUDAP 741097/11).

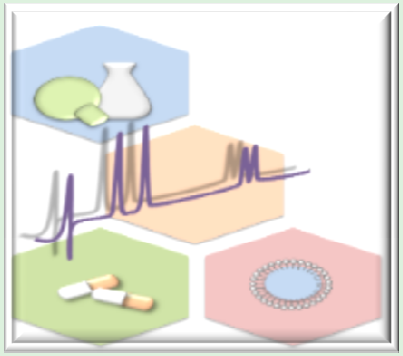
Centro de Investigación, Desarrollo y Control Farmacéutico

Centro de Investigación, Desarrollo y Control Farmacéutico

Investigación

Actividades de transferencia

Formación de recursos humanos



Equipamiento

HPLC-MS/MS y UV/CE
DLS
Ultraturrax
Viscocimetros
Liofolizador
Disolutor

Financiamiento

UBA
CONICET
PICT
Actividad de Transferencia Tecnológica

Sistema de calidad

Formulaciones Huérfanas desarrolladas y caracterizadas

Coenzima Q10
Emulsión

Omeprazol
suspensión

Acido ursodesoxicólico
Suspensión

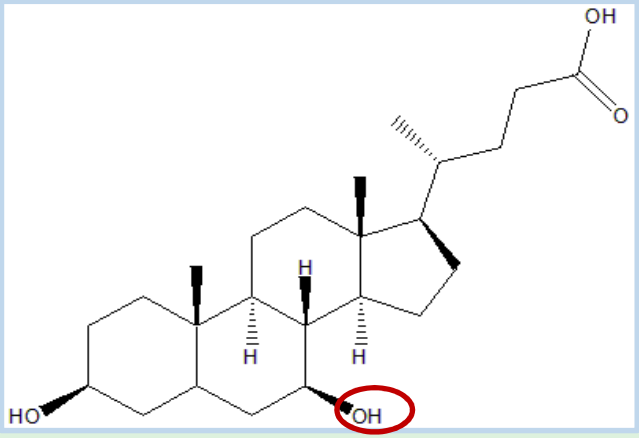
Citrulina
solución

Idebenona
Suspensión

Glibenclamida
Suspensión

Benzodiacepinas
Soluciones

ACIDO URSODESOXICOLICO



- También conocido como URSODIOL
- Agentes micelares
- Acido Biliar secundario, hidroxiderivado del acido 5-β-24-colanoico
- **pKa:** 4,6
- **BCS**: clase II: baja solubilidad acuosa y alta permeabilidad intestinal
- **Orientación** del 7β-OH, hidrofobicidad y detergencia
- **Dosis:** 15-30 mg/kg/día (cada 8 horas)

Agente terapéutico en pediatría

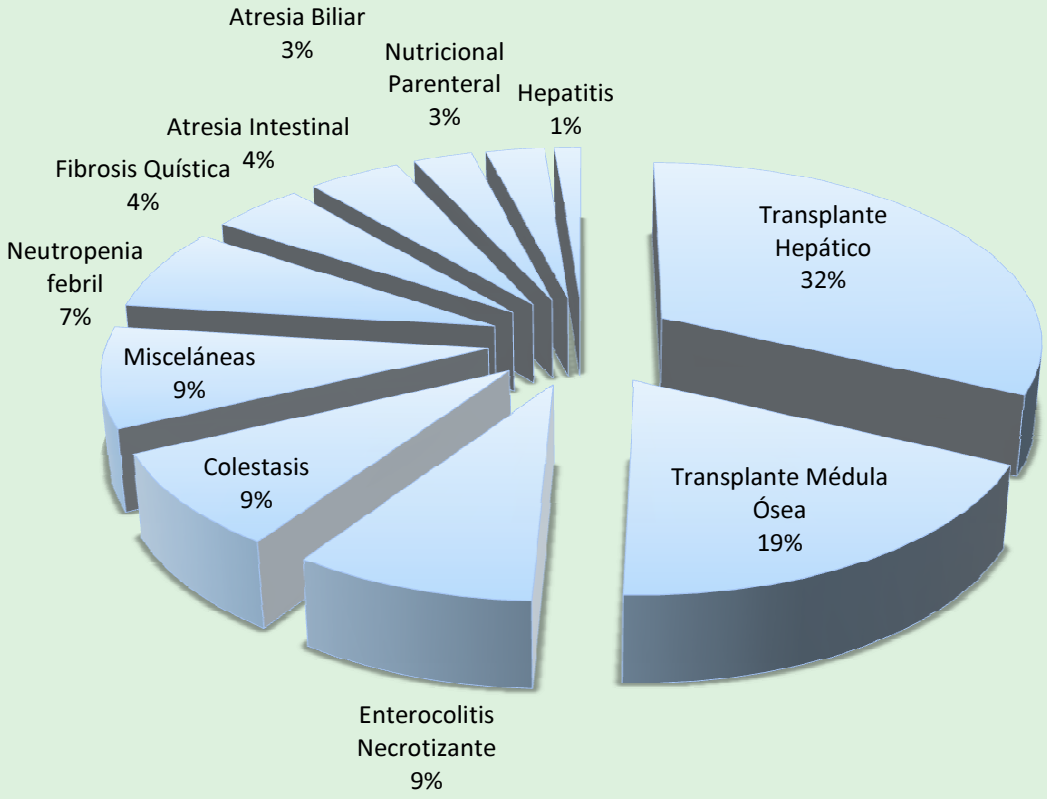
Litolitico

Enfermedades hepáticas colestásicas

Trasplantes hepáticos

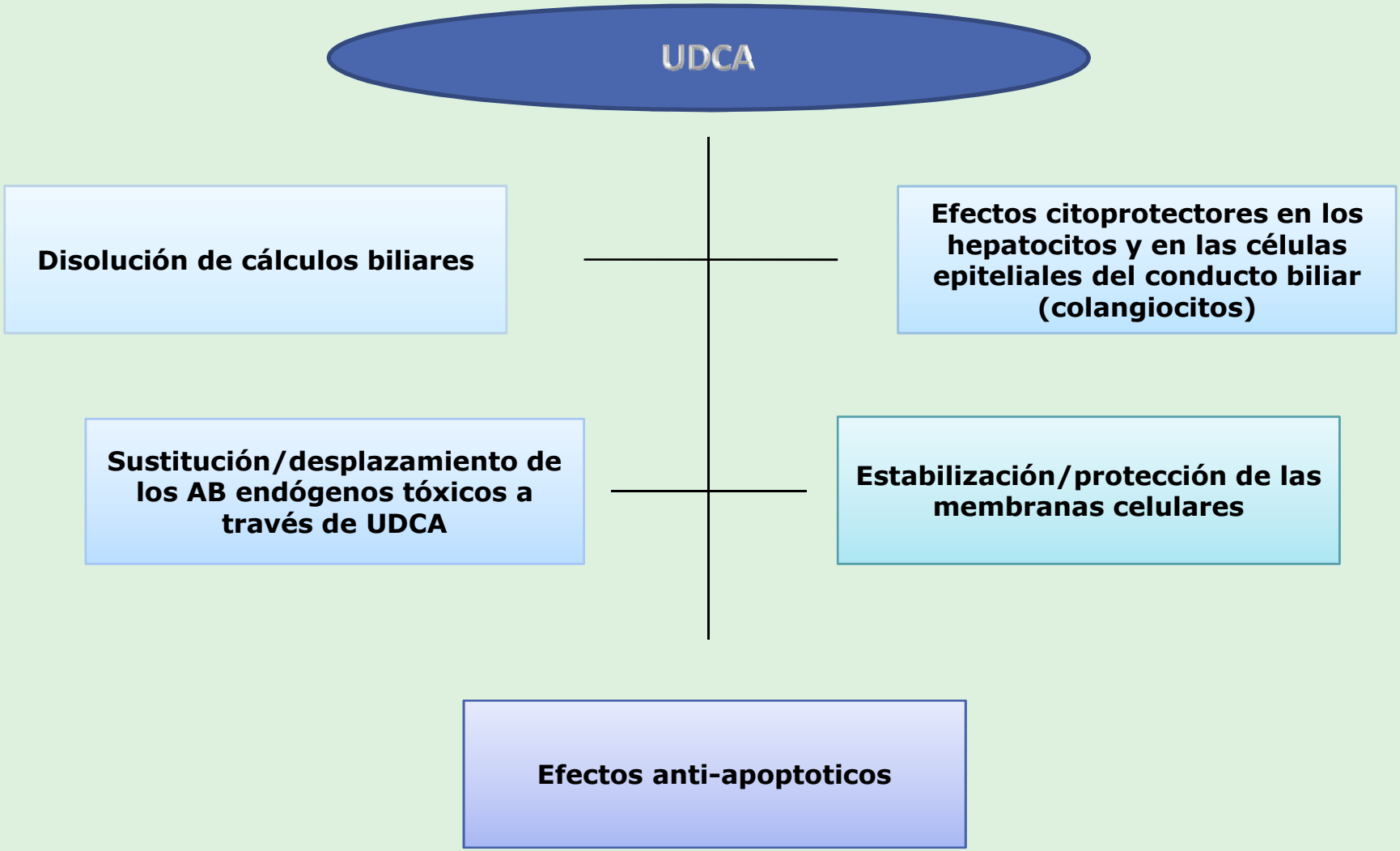
ACIDO URSODESOXICOLICO

Aplicación de UDCA en patologías pediátricas



Hospital de Pediatría J.P. Garraham, 2017-2018

MECANISMOS DE ACCIÓN



Formulaciones de UDCA

Formulaciones sólidas (comprimidos o cápsulas)

Formulaciones liquidas:

- ✓ Dificultad de ingerir formulaciones sólidas
- ✓ Correcta dosificación, adaptadas al paciente
- ✓ Pacientes sondados
- ✓ Falta de adherencia al tratamiento

Desarrollo de Formulaciones huérfanas de UDCA

Medicamentos Eficaces, seguros y estables

Propiedades fisicoquímicas

Solubilidad: prácticamente insoluble en agua (0,02 mg/ml a 20 °C), soluble en etanol

Desarrollo de la formulación

Suspensión

Estudio de estabilidad

SUSPENSIONES

UDCA	2.5 g
Glicerina	5 ml
Vehículo para UDCA c.s.p	100 ml

Vehículo

Goma Xántica	0,2 g
Nipagin	0,08 g
Nipasol	0,02 g
Agua destilada c.s.p	100 ml

UDCA	2,5 g
Goma Xántica	0,4 g
Lecitina de soja	0,1 g
Glicerina	5 ml
Sacarina Sódica	0,2 g
Fosfato monoácido de potasio	0,052 g
Fosfato diácido de potasio	0,041 g
Nipagin	0,16 g
Nipasol	0,02 g
Agua destilada c.s.p	100 ml

Estudio de estabilidad fisicoquímica y microbiológica de las formulaciones de UDCA

Tiempo de muestreo: días
0 – 7 –14 – 30 – 60 – 90 - 120

Temperatura: 4ºC - 25 ºC – 40 ºC

Evaluación (fisicoquímica)

- ✓ Aspecto
- ✓ pH
- ✓ Resuspendibilidad
- ✓ Viscosidad
- ✓ Tamaño de partículas
- ✓ Contenido del activo y sustancias relacionadas
- ✓ Ensayos microbiológicos

Estudio de estabilidad fisicoquímica y microbiológica de las formulaciones de UDCA

Evaluación (fisicoquímica)

- ✓ **Aspecto**: observación visual, color, olor, sabor
- ✓ **pH**: pHmetro digital medida por triplicado.
- ✓ **Resuspendibilidad**: 50 ml (3 hs.) agita manualmente
- ✓ **Viscosidad**: Brookfield, spin 1
- ✓ **Tamaño de partículas**: Mastersizer 2000
- ✓ **Contenido del activo y sustancias relaciondas**:
  HPLC-UV (90-110 %) y HPLC-MS/MS

Ensayo microbiológico: **USP, productos no estériles <1111 >**

Formulaciones orales liquidas

- ✓ Total de aerobios < 102 ufc/ml
- ✓ Hongos y levaduras < 101 ufc/ml
- ✓ Ausencia de Escherichia coli

Estudio de estabilidad fisicoquímica de las formulaciones de UDCA

Evaluación (fisicoquímica)
Suspensión A

	4°C (0 – 120 días)	25 °C (0 – 120 días)	40 °C (0 – 120 días)
Aspecto Amarillo/Insípido/ Inodoro/homogéneo	S/C	S/C	S/C
pH	5,2 – 5,1	5,2– 4,6	5,2 – 4,5
Resuspendibilidad	FR	FR-R	FR-R
Viscosidad (mPa.s)	1200 – 1000	1200 - 900	1200 - 300
Tamaño de partículas	24 – 23 um	24 – 23 um	24 – 23 um

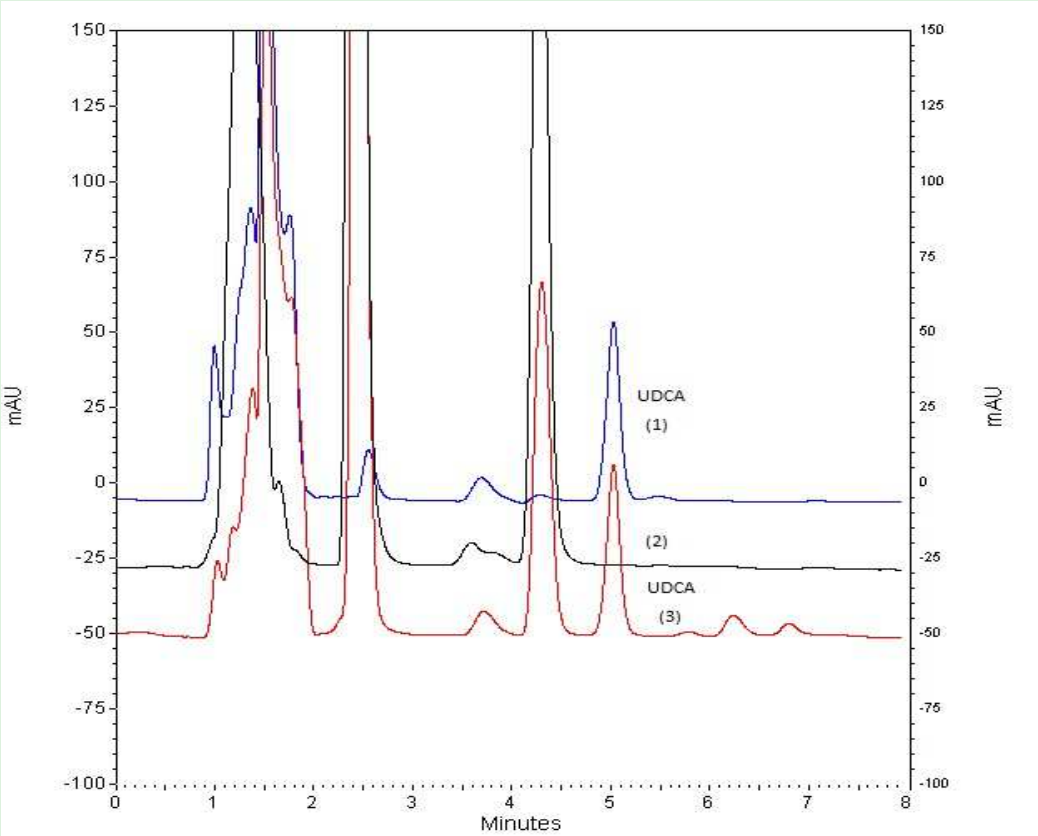
Estudio de estabilidad fisicoquímica de las formulaciones de UDCA

Evaluación (fisicoquímica)
Suspensión B

	4°C (0 – 120 días)	25 °C (0 – 120 días)	40 °C (0 – 120 días)
Aspecto Amarillo/Dulce/ Inodoro/homogéneo	S/C	S/C	S/C (rancio)
pH	7,2 – 7,3	7,2 – 7,3	7,2 – 6,7
Resuspendibilidad	FR	FR-R	FR-R
Viscosidad (mPa.s)	2000 – 1900	2000 -1800	2000 -1200
Tamaño de partículas	24 – 25 um	24 – 23 um	24 – 23 um

Estudio de estabilidad fisicoquímica de las formulaciones de UDCA

Contenido



Columna Symmetry C18 (4,6 mm x 150 mm i.d, 5 µm)

Temperatura : 40°C

Volumen de inyección: 100 µl

Longitud de onda: 200 nm

Flujo: 1mL/min

Fase Móvil: ACN : H_2O pH 3 con H_3PO_4 (48:52)

Tiempo de Análisis: 8 min

(1): Estándar de UDCA 307 µg/mL; (2): Blanco de excipientes; (3): Suspensión de UDCA 265 µg/mL

VALIDACIÓN

Linealidad (µg/ml)		202-606
		y=216,87 x +2744,9
R^2		0,9903
LOD (µg/mL)		0,32
LOQ (µg/mL)		1,08
Precisión (RSD)		
En el día (n=6)		
	Respuesta	0,81
	Tiempo	0,14
Entre días (n=18)		
	Respuesta	2,02
	Tiempo	0,45
Exactitud		
80%		99,6 % (n=3 RSD= 0,49)
100%		101,3 % (n=3 RSD= 0,25)
120%		99,2 % (n= 3 RSD= 0,23)

Estudio de estabilidad fisicoquímica de las formulaciones de UDCA

Contenido (Química)

Especificación: No menos del 90% y no mas del 110% de la concentración inicial de UDCA

SA			
Tiempo (días)	4°C (%)	25°C (%)	40°C (%)
0		100,0 (1,2)*	
7	99,9 (1,8)	108,4 (2,1)	108,8 (0,5)
14	105,1 (1,8)	102,5 (2,0)	109,3 (0,3)
30	109,4 (0,5)	95,6 (1,3)	109,9 (1,2)
60	94,1 (0,7)	101,2 (0,4)	93,9 (0,7)
90	98,3 (1,9)	100,4 (0,5)	94,1 (2,3)
120	95,6 (0,2)	90,8 (0,8)	63,6 (1,7)

SB			
Tiempo (días)	4°C (%)	25°C (%)	40°C (%)
0		100,0 (1,1)*	
7	106,2 (0,5)	95,6 (0,6)	101,5 (1,9)
14	105,9 (1,1)	102,8 (0,7)	108,1 (0,2)
30	106,2 (0,6)	107,5 (1,5)	108,5 (1,0)
60	100,7 (0,4)	101,5 (0,7)	100,6 (0,2)
90	104,5 (1,3)	106,1 (0,1)	110,3 (0,7)
120	99,5 (1,1)	101.9 (0,3)	96,8 (1,1)

Estudio de estabilidad microbiológica de las formulaciones de UDCA

Estabilidad (microbiológica)

SA y SB
T: 4, 25 y 40
T: 0 a 120 días

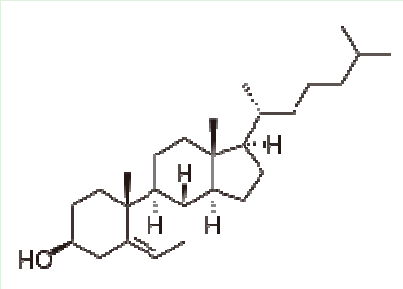
Aerobios totales: < 10 ufc

Hongos y levaduras: < 10 ufc

Ausencia EC

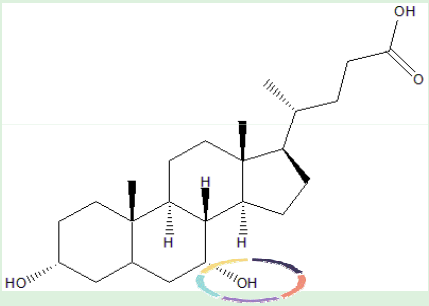
El ensayo microbiológico cumple con las especificaciones de las USP

BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS BILIARES

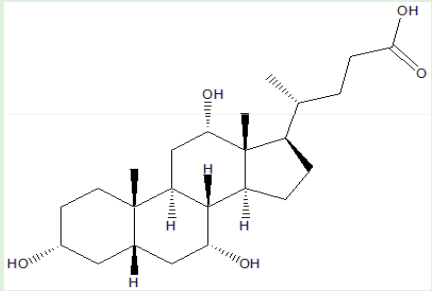


COLESTEROL

PRIMARIOS (Hígado)

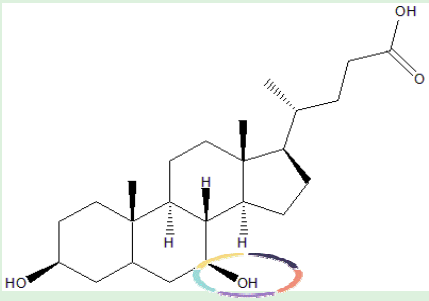


Ácido Quenodesoxicólico (CDCA)

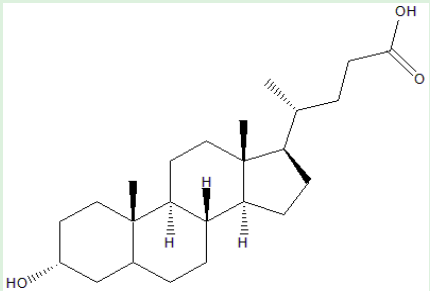


Ácido Cólico (CA)

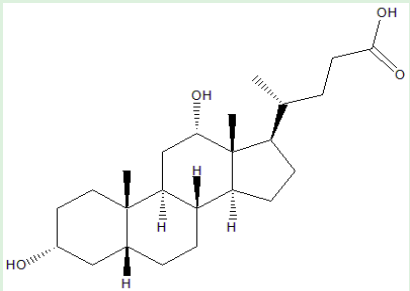
SECUNDARIOS (Bacterias intestinales)



Ácido Ursodesoxicólico (UDCA)



Ácido Litocólico (LCA)



Ácido Desoxicólico (DCA)

Sustancias relacionadas

ESPECIFICACIONES DE LA USP Y EP

UDCA

USP

- CDCA 1,5%
- LCA 0,05%
- DCA <0,1%
- CA <0,1%

EP

- CDCA 1,0%
- CA 0,5%
- LCA 0,1%
- DCA <0,25%

INSTRUMENTACIÓN
Cromatografía Liquida Ulimate 3000 (Thermo Fisher Scientific
TSQ Quantum Access MAX (Thermo Fisher Scientific)
Sistema de datos Xcalibur 2.1.

SISTEMA CROMATOGRÁFICO

CONDICIONES ANALÍTICAS - HPLC

MÉTODO ISOCRÁTICO

Columna Symmetry C18 (4,6 mm x 150 mm, 5 µm)

Temperatura : 40°C

Volumen de inyección: 20 µl

Flujo: 0,6 mL/min

Fase Móvil: MeOH : ACN : Acetato de amonio 10 mM pH 7,6
(40:40:20)

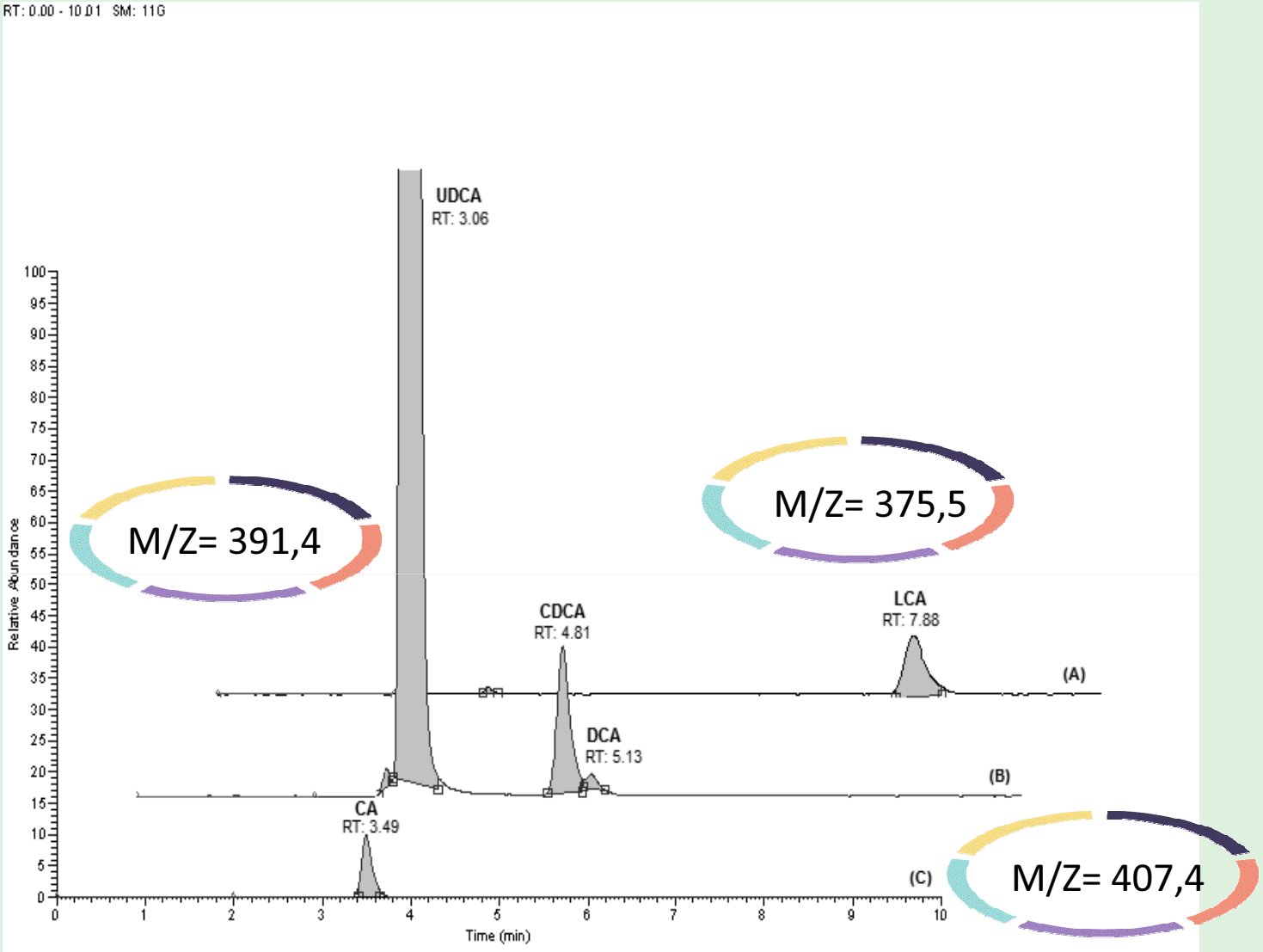
Tiempo de análisis: 10 min

CONDICIONES DEL DETECTOR

Triple cuadrupolo TSQ Quantum Access Max

ESI (ionización por electrospray)

Polaridad	Negativo	
Modo de análisis	SRM	
Voltaje del spray	4300 eV	
Temperatura del capilar	275°C	
Gas envolvente (N_2)	60	Calidad y estabilidad de pulverización
Gas auxiliar (N_2)	30	
Gas de colisión	Argón	
Presión de colisión	5 eV	



Solución estándar: UDCA, CA, DCA, CDCA y LCA.
(A): LCA (21 ng / mL)
(B): CDCA (422 ng / mL), DCA (119 ng / mL)
(C): CA (207 ng / mL)

VALIDACIÓN

PARÁMETROS	CA	DCA	CDCA	LCA
Rango lineal (ng/mL)	50-625	25-425	50-800	10-115
R^2	0.9976	0.9952	0.9901	0.9999
LOD (ng/mL)	0.29	0.59	0.13	0.44
LOQ (ng/mL)	0.96	1.96	0.45	1.47
Precision (RSD)				
Intra-día (n = 6)				
Área	1.1	0.2	2.1	0.6
Tiempo	0.1	0.3	0.3	0.1
Intra dias (n = 12)				
Área	2.0	2.5	2.3	1.2
Tiempo	0.2	0.3	0.3	0.2

Exactitud	80%	100%	120%	80%	100%	120%	80%	100%	120%	80%	100%	120%
Materia prima	100.2 (0.3)*	98.6 (1.0)*	95.0 (0.7)*	100.9 (1.1)*	104.5 (1.3)*	105.3 (0.6)*	100.5 (1.8)*	96.5 (1.3)*	97.8 (1.0)*	102.7 (0.8)*	97.1 (0.3)*	106.3 (1.6)*
SA	96.3 (0.4)*	83.5 (1.2)*	109.8 (1.9)*	85.7 (2.1)*	83.0 (1.6)*	91.9 (0.6)*	90.7 (1.4)*	90.0 (1.2)*	99.6 (1.8)*	91.0 (2.2)*	87.0 (0.8)*	99.4 (1.12)*
SB	93.4 (2.6)*	108.9 (0.9)*	104.7 (1.0)*	96.3 (1.1)*	90.6 (1.2)*	106.0 (0.6)*	91.8 (0.8)*	96.7 (1.8)*	104.8 (1.3)*	93.5 (1.4)*	90.7 (1.8)*	106.2 (0.4)*

*Valores de RSD correspondientes a n = 3

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE LAS SUSTANCIAS RELACIONADAS

	CA (%)		DCA (%)		CDCA (%)		LCA (%)	
Límite	USP <0.1%	EP 0.5%	USP < 0.25%	EP < 0.1%	USP 1.5%	EP 1.0%	USP 0.05%	EP 0.1%
Materia prima	-		-		1.1 (1.9)*		0.025 (1.2)*	
SB	-		-		0.002 (0.8)*		0.0003 (1.7)*	
SA	-		-		0.002 (1.7)*		0.0002 (0.3)*	

*Valores de RSD correspondientes a n = 3

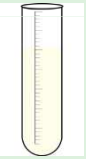
El contenido de las sustancias relacionadas en la materia prima y en las suspensiones cumple con las especificaciones de la USP y la EP, a excepción del CDCA en la materia prima que no cumple con la EP

TEST DE DISOLUCIÓN

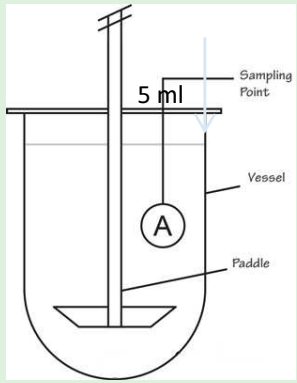
Especificación de acuerdo a la monografía de la USP 31: No menos del 80% de la cantidad indicada de UDCA se disuelve en 30 minutos

MÉTODO

- Medio de disolución: 900 ml buffer fosfato 0,05 M pH 8,4.
- Equipo: Disolutor II 75 rpm
- Temperatura: 37 °C
- Tiempo: 30 min
- Muestras: SA - SB
- Solución de referencia: SC
- Volumen de muestra: 10 ml



SUSPENSIÓN DE UDCA

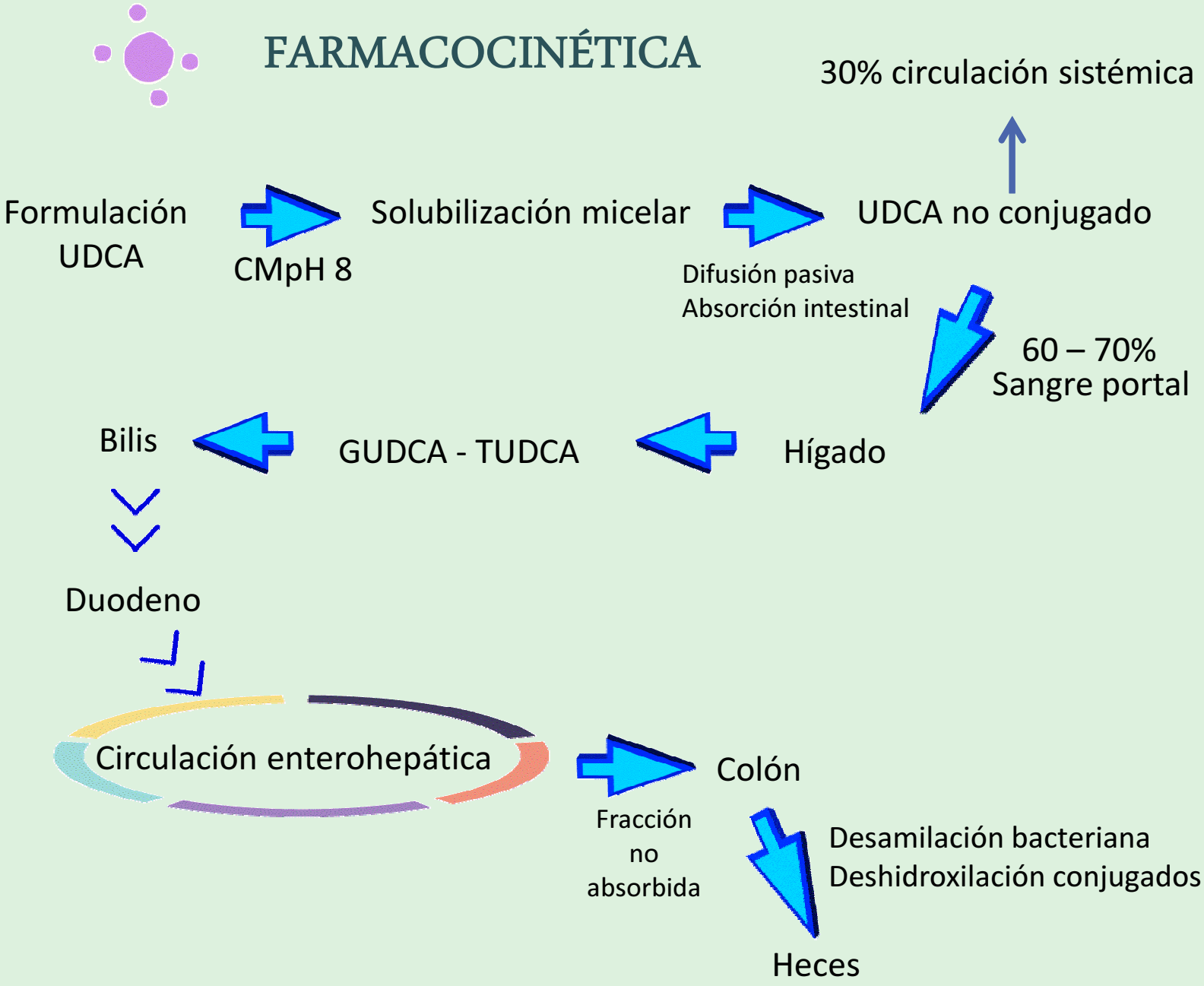


Muestras	% de disolución
SA	91,6
SB	97,2
SC	97,9

El ensayo de disolución cumple con las especificaciones de las USP

DETERMINAR LA BIODISPONIBILIDAD Y LOS PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE LAS FORMULACIONES DESARROLLADAS EN RATAS EN COMPARACIÓN CON EL COMPRIMIDO DE UDCA LUEGO DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL MEDIANTE MICRO HPLC-MS/MS

FARMACOCINÉTICA



DISEÑO EXPERIMENTAL

- Ratas macho Sprague Dowley P= 280-330 gramos
- Condiciones: Ciclo 12 hs luz/oscuridad

  Ambiente 22 ± 2 °C

  Alimento estándar para roedores y agua ad libitum

  5 días de aclimatación y ayunados durante 6 horas
- Grupos aleatorios: n=6
- Administración: vía oral en animales despiertos inmovilizados físicamente durante aproximadamente 15 segundos.
- Dosis única 20 mg/kg
- Volumen de administración: 0,20 – 0,30 ml
- Obtención de muestras: sangre venosa de la cola a diferentes tiempos (0; 5; 15; 30; 60; 120, 180, 240; 360; 480, 600, 720 min)
- Referencia: SC (25 mg/ml, comprimido de UDCA en agua)
- Muestras: SA y SB (25 mg/ml)

SISTEMA CROMATOGRÁFICO

CONDICIONES ANALÍTICAS - HPLC

Sistema validado por nuestro grupo de trabajo

Microcolumna BDS Hypersil C18 (100 mm x 2,1 mm, 2,4 µm) con guarda columna

Temperatura : 30˚C

Volumen de inyección: 10 µl

Flujo: 0,6 mL/min

Fase Móvil A: MeOH : ACN (3:1)

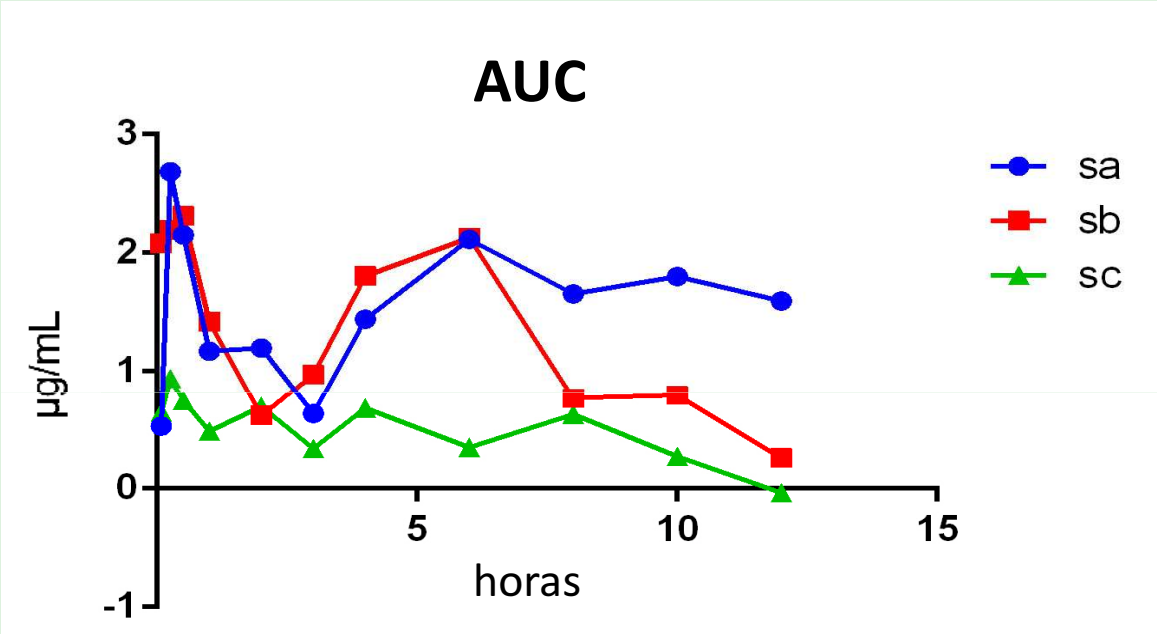
Fase Móvil B: Acetato de amonio 10 mM

Tiempo de análisis: 27 min

GRADIENTE CROMATOGRÁFICO

Tiempo (min)	% A	% B	Flujo (mL/min)
0,0	60	40	0,2
14,0	80	20	0,2
16,0	80	20	0,2
17,0	100	0	0,2
17,5	100	0	0,4
22,0	100	0	0,4
22,1	100	0	0,3
23,1	60	40	0,3
23,5	60	40	0,2
27,0	60	40	0,2

RESULTADOS



PARÁMETROS	ABC_{0-12} ($\mu g ml^{-1} h$)	$IABC_{0-12}$ ($\mu g ml^{-1} h$)	Tmáx (h)	Cmáx (µg/ml)
SA	15,8	19,0	0,30	2,7
SB	16,6	14,5	0,50	2,3
SC	10,4	5,4	0,25	0,9

CONCLUSIONES

✓Se desarrollaron dos formulaciones liquidas orales de UDCA, sencillas, con estabilidad fisicoquímica y microbiológica adecuada para pacientes pediátricos. Las formulaciones líquidas mejoran la biodisponibilidad de UDCA in vivo en ratas en comparación con el comprimido disperso en agua.

✓Formulaciones huérfanas liquidas permiten la adecuada dosificación del paciente

✓CIDEC desarrollo y caracterización de formulaciones huérfanas trabajando conjuntamente con el Hospital Garraham, logrando una verdadera transferencia hacia la pacientes pediátricos

Dra. Manuela Martinesfki

Prof. Dr. Fabian Buontempo

Prof. Dra. Silvia Lucangioli

Prof. Dra. Valeria Tripodi

Dr. Diego Chiappetta

Dra. Sabrina Flor

Dr. Ezequiel Bernabeu

Dr. Mario Contin

CIDEC-FFYB

CENTRO DE INVESTIGACIÓN, DESARROLLO Y CONTROL FARMACÉUTICO

Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Dra. Cecilia Dobrecky

Dra. Marcela Moretton

Farm. Cristian Becerra

Farm. Oriana Boscolo

Bioq. Francisco Baez

Farm. Leandro Salvo

Farm. Silvia Scioscia

cidec@ffyb.uba.ar
slucangi@ffyb.uba.ar