DETALLA MODELO EXPERIMENTAL PARA DETERMINAR LA PERMEABILIDAD INTESTINAL EN MONOCAPAS CELULARES

El Subdepartamento de Registro Sanitario de Productos Farmacéuticos Bioequivalentes, perteneciente al Departamento Agencia Nacional de Medicamentos (ANAMED), ha considerado necesario indicar lineamientos para la ejecución y presentación de resultados de estudios de permeabilidad en monocapas celulares en el contexto de estudios de bioexención basados en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (SCB), mencionado como modelo experimental en la Guía Técnica G-BIOF 02.

1. INTRODUCCIÓN

Los estudios de permeabilidad *in vitro* realizados en monocapas celulares son reconocidos internacionalmente como un método que permite estimar el grado de absorción de un principio activo (API, de sus siglas en inglés) en humanos.

Estos ensayos pueden ser empleados en una solicitud de bioexención basada en el SCB para:

- Determinar la clasificación de permeabilidad de un API.
- Demostrar experimentalmente que las diferencias cualitativas y/o cuantitativas de los excipientes utilizados en la formulación no influyen en la absorción del principio activo clase I o III, según sea el caso.

El presente documento recoge los lineamientos internacionales armonizados sobre los requisitos para la realización de ensayos de permeabilidad en líneas celulares de los lineamientos del documento "*Annex I: Caco-2 cell permeability assay method considerations. Biopharmaceutics Classification System-Based Biowaiver (M9) ICH (Internationalcouncil For Harmonisation Of Technical Requirements For Pharmaceuticals For Human Use) Harmonised*"; adoptada desde el 2019, así como también aquel conocimiento derivado de la experiencia práctica que surge de la tarea diaria en la evaluación de los estudios y antecedentes de permeabilidad, por parte de este Instituto, como también de su ejecución por parte de los interesados.

La implementación de este enfoque metodológico únicamente puede llevarse a cabo por centros bioexención autorizados/reconocidos por el Instituto de Salud Pública para este fin.

2. FUNDAMENTO DEL ENSAYO EN MONOCAPAS CELULARES

Los estudios de permeabilidad en monocapas celulares de la línea Caco-2 o células epiteliales justificadas y validadas, proporcionan una metodología de estimación de la absorción oral de fármacos. Estas monocapas celulares deben presentar uniones estrechas (*tight junctions*), además, de una clara polarización (cara apical y basolateral) que imite la estructura del epitelio intestinal. El sistema de ensayo comprende dos compartimentos separados por una monocapa de células epiteliales sobre un filtro poroso semipermeable para representar el paso de un fármaco desde el lumen intestinal al torrente sanguíneo, como se observa en la Figura 1.

Debido a la expresión de los diferentes componentes que definen las características morfológicas y funcionales de una línea celular, es necesario que ésta sea previamente validada y caracterizada. Adicionalmente, se debe controlar su origen (debe ser trazable), las condiciones de almacenamiento y el número de pasajes de la línea celular.

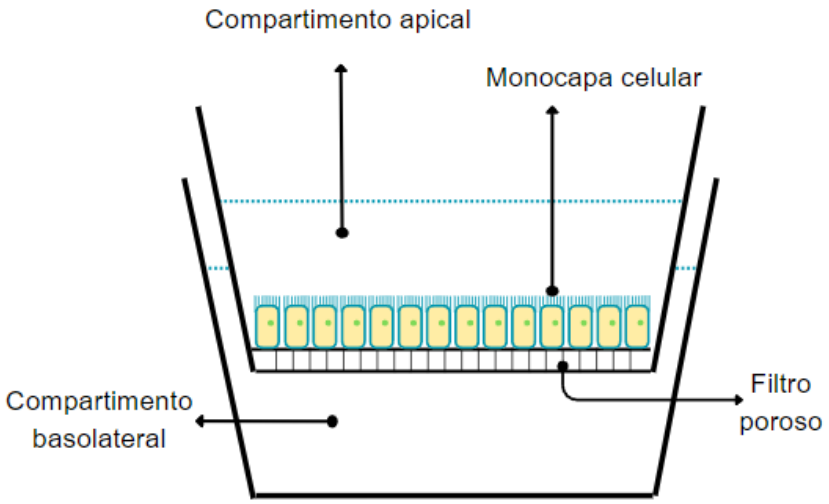

Figura 1. Esquema de un inserto empleado en el sistema de ensayo.

3. SITUACIONES EN LAS QUE UN ESTUDIO DE PERMEABILIDAD EN MONOCAPAS CELULARES NO ES APLICABLE PARA UNA BIOEXENCIÓN:

- La formulación contenga excipientes que afecten la motilidad intestinal (por ejemplo: sorbitol, manitol), ya que este fenómeno no se puede evaluar en este tipo de ensayos.
- El producto farmacéutico contenga un principio activo con mecanismo de transporte preferentemente activo o con una alta actividad como sustrato de una bomba de eflujo de xenobióticos (por ejemplo: glicoproteína-P).
- La formulación y/o principio activo de un producto sólido de administración oral no cumpla con los requisitos de una bioexención basada en el SCB (numeral 4.1 de la guía técnica G-BIOF 02).

En los casos descritos, corresponderá realizar un estudio in vivo de biodisponibilidad comparativa.

4. DEMOSTRACIÓN DE COMPETENCIA – VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA

Todo centro de bioexención autorizado/reconocido para realizar de estudios de permeabilidad debe realizar la validación de la técnica. Esta consiste en establecer un *ranking* entre los valores de permeabilidad experimentales obtenidos por el laboratorio con valores de fracción absorbida (Fa) observada *in vivo* en humanos para al menos 15 fármacos modelos (véase con mayor detalle en Anexo I), según clasificación ICH.

Los centros de bioexención autorizados/reconocidos deben mantener una base histórica de datos y utilizar estos para confirmar que la reproducibilidad del método se mantiene en el tiempo, a partir de lo reportado durante la validación de la técnica.

5. METODOLOGÍA:

5.1 Consideraciones

1. Es necesario realizar una búsqueda bibliográfica preliminar sobre las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéticas del principio activo (API) en estudio y el posible efecto de los excipientes sobre su absorción. Esto permite discutir los resultados y las limitaciones propias del sistema de ensayo.

2. Las condiciones del ensayo, los procedimientos involucrados en el cultivo y el manejo de la línea celular deben ser los mismos empleados durante la validación de la técnica. De no ser así, el cambio de las condiciones debe ser debidamente justificado mediante una validación parcial.

3. Se debe evaluar la recuperación de todos los fármacos incorporados en el sistema de ensayo (fármacos en estudio, controles internos y fármaco modelo de sustrato de eflujo). La recuperación promedio no debe ser inferior al 80% con un coeficiente de variación menor a 15%. En caso de no cumplir con este criterio deben ser justificadas mediante un balance de masas.

4. Para determinar la concentración de las muestras, se recomienda comenzar con una solución madre obtenida al disolver la formulación en estudio en 250 mL de solución de trabajo. Esta solución madre, puede ser diluida hasta una concentración de trabajo conocida y que estará en contacto con la línea celular. Con el objetivo de que aquellos excipientes no solubilizados no se encuentren presentes en el ensayo de permeabilidad, las muestras deberán filtrarse con un tamaño de poro de 5um o mayor. Se sugiere trabajar en el rango de concentraciones utilizadas para demostrar transporte pasivo (ver punto 5). La permeabilidad aparente (Papp) puede ser calculada utilizando dos enfoques diferentes:

a) Cinético: Cuantificando la cantidad de fármaco acumulado en el compartimento receptor en diferentes intervalos de tiempo.
b) En estado estacionario: Cuantificando la cantidad de fármaco acumulado en el compartimento receptor en un tiempo final de ensayo. Esta aproximación debe demostrar que el principio activo en su matriz en estudio alcanza el estado estacionario al tiempo de realización del estudio de permeabilidad.

Se recomienda realizar un ensayo de viabilidad celular para verificar que la monocapa es viable.

Ambos enfoques proporcionan información para comprender el paso de una sustancia a través de una membrana biológica.

5.2 Controles de calidad del ensayo

5.2.1. Integridad de la monocapa

Para obtener resultados confiables, es necesario demostrar que la monocapa no sufrió un deterioro en sus propiedades de barrera evaluando su integridad previo y posterior al ensayo.

Previo al ensayo, debe realizar una medición de la Resistencia Eléctrica Transepitelial (TEER, de sus siglas en inglés) en al menos un 25% de los insertos totales utilizados para el estudio. El resultado debe encontrarse dentro del criterio de aceptación establecido en la validación para asegurar que se ha alcanzado la confluencia. Al finalizar el estudio, se mide nuevamente TEER, pero en insertos diferentes a la primera medición.

O bien, debe incorporar una evaluación de la integridad de membrana mediante la evaluación de permeabilidad de un fármaco modelo que sea transportado a través de la vía paracelular, permitiendo evaluar el desarrollo de uniones estrechas.

Además, se debe evaluar el paso de un fármaco modelo de permeabilidad cero a través de la monocapa en todos los insertos utilizados en el estudio (ver ejemplos en Anexo 1). El criterio de aceptación de este fármaco modelo debe ser establecido durante la validación de la técnica.

5.2.2. Controles internos

El ensayo debe incluir un fármaco modelo de alta y uno de media permeabilidad como controles internos. Los valores Papp de estos fármacos modelos deben ser consistentes entre los distintos ensayos y con los valores reportados durante la validación de la técnica.

5.2.3. Evaluación del mecanismo de transporte del principio activo

Debido a que los sistemas celulares pueden presentar variación en la expresión de proteínas de transporte, este tipo de estudios se limita a la evaluación de productos que contengan principios activos que sean absorbidos principalmente mediante mecanismos de transporte pasivo y sin actividad como sustrato de una bomba de eflujo de xenobióticos.

Para demostrar el transporte pasivo aparente de un principio activo, se puede emplear uno de los siguientes procedimientos:

a) Razón de eflujo: Demostrar que la permeabilidad del principio activo es independiente de la dirección de transporte. Esta vía implica la evaluación del transporte del principio activo en dirección apical hacia basolateral y basolateral hacia apical. Se debe calcular la razón de eflujo según la ecuación:

$$Razon\ de\ eflujo\ (RE) = \frac{Papp_{B\rightarrow A}}{Papp_{A\rightarrow B}}$$

Donde:

- $Papp_{B\rightarrow A}$: Permeabilidad en dirección basal hacia apical
- $Papp_{A\rightarrow B}$: Permeabilidad en dirección apical hacia basal

El principio activo será considerado sustrato de transporte activo cuando la RE sea ≥ 2.

b) Saturación de transportador: Demostrar que la permeabilidad del principio activo es independiente de su concentración. Esto puede realizarse utilizando concentraciones iniciales en el compartimento donador equivalentes, por ejemplo, a: 0,01; 0,1 y 1 veces la concentración resultante de disolver la máxima potencia registrada en el país en 250 mL. Si se detectan cambios en la permeabilidad, es probable que se deban a la saturación de un transportador, lo que significa que el transporte del principio activo ya no puede ser considerado pasivo.

5.2.4 Expresión funcional de transportadores de eflujo

Se debe demostrar la expresión funcional de transportadores de eflujo para el modelo de trabajo. Para ello debe realizar el procedimiento a) "Razón de eflujo" con el fármaco modelo sustrato de eflujo validado. Obteniendo resultados consistentes con lo validado.

5.3 Ensayo para determinar la clasificación de permeabilidad del principio activo

Para obtener una estimación confiable de la permeabilidad, es necesario considerar un mínimo de 12 insertos del API de prueba. Se considera que un API es altamente permeable cuando su valor de Papp es igual o mayor que el del control interno seleccionado de alta permeabilidad (ver Anexo 1).

Es importante destacar que, cuando se clasifique un API de alta permeabilidad, también se debe demostrar su estabilidad gastrointestinal. Cualquier degradación del fármaco superior al 10% no permitirá que sea clasificado de alta permeabilidad.

5.4 Ensayo comparativo para demostrar que los excipientes utilizados en la formulación no afectan a la absorción del API

El ensayo debe considerar un mínimo de 12 insertos para el producto farmacéutico en estudio y 12 insertos para el producto de referencia. Se debe evaluar el transporte de ambos productos en dirección apical-basolateral en las mismas condiciones experimentales.

Además, se recomienda evaluar el API, sin la formulación, para demostrar el comportamiento en el sistema de ensayo y clasificar provisoria de su permeabilidad.

Para demostrar que los excipientes utilizados en la formulación no afectan a la absorción del API, se debe aplicar una prueba estadística apropiada enfocada a determinar diferencias estadísticamente significativas entre las permeabilidades del producto de prueba y su referencia. Por ello, se debe incluir un reporte estadístico que sustente el uso de la prueba estadística.

ANEXO 1.- Validación de la técnica de ensayo de permeabilidad en monocapas celulares

Antes de validar la técnica, se debe llevar a cabo una caracterización de la línea celular. Esto implica la evaluación del patrón de expresión de transportadores de eflujo (ej. P-gp, BCRP, MRP2) y de captación (ej. PepT1, OATP2B1, MCT1). Además, es necesario establecer el número de pasaje, las condiciones de cultivo y criterios de aceptación para los diferentes controles de calidad del ensayo (integridad de la monocapa, controles internos y fármaco modelo sustrato de eflujo).

Para la validación de la técnica se deben evaluar la Papp (Permeabilidad aparente) de, al menos, cinco fármacos modelo de cada rango de permeabilidad (alta, media y baja), cada uno por triplicado. Estos pueden ser los recomendados en la Tabla 1 u otros, siempre que se adjunte bibliografía que respalde el valor de Fa (fracción absorbida) del fármaco *in vivo*. Con estos resultados se debe establecer un ranking entre los valores de Papp experimentales con valores de Fa observada *in vivo* en humanos. El ranking establecido debe ser capaz de clasificar cada API dentro de uno de los tres rangos de permeabilidad.

Los resultados deben presentarse en una tabla que contenga el valor de Papp (promedio, desviación estándar, coeficiente de variación), su clasificación de permeabilidad y el grado de absorción en humanos (Fa). Además, se debe incluir un gráfico de la Fa en función de la Papp, en el cual se delimitan las tres zonas de cada rango de permeabilidad, como se muestra en la Figura 2.

La validación debe incluir todos controles de calidad descritos en el punto 5.2.

Al presentar el informe de validación de la técnica, se debe adjuntar documentos que respalden la caracterización de la línea celular. Esto, permite evaluar cómo se determinaron los criterios de aceptación de los controles de calidad.

El fármaco modelo de alta permeabilidad seleccionado servirá para respaldar la reproducibilidad del método y clasificar a un principio activo como de alta o baja permeabilidad según SCB. Este control interno debe ser seleccionado según su valor de permeabilidad, que debe estar cercano al límite de clasificación de alta permeabilidad (Fa ~

85%). Además, se seleccionará un fármaco modelo de media permeabilidad para demostrar la consistencia del método.

Tabla 1. Fármacos modelo recomendados para validación

Rango	Fármacos modelo	
Alta Permeabilidad (Fa ≥ 85%)	Antipirina Cafeína Ketoprofeno Naproxeno Teofilina Metoprolol	Propranolol Carbamazepina Fenitoína Disopiramida Minoxidilo
Media Permeabilidad (Fa = 50-84%)	Clorfenamina Creatinina Terbutalina Hidroclorotiazida Enalapril	Furosemida Metformina Amilorida Atenolol Ranitidina
Baja Permeabilidad (Fa < 50%)	Famotidina Nadolol Sulpirida Lisinopril Aciclovir	Foscarnet Manitol Clorotiazida Polietilenglicol 400 Enalaprilato
Permeabilidad Cero	FITC-Dextrano Amarillo Lucifer Lactulosa	Inulina Polietilenglicol 4000
Sustratos de eflujo	Digoxina Paclitaxel	Quinidina Vinblastina

**Nota: Es importante destacar que algunos de los fármacos modelo recomendados pueden involucrar un componente activo en su mecanismo de transporte, estos fármacos han demostrado que las permeabilidades en células Caco-2 se correlacionan de forma adecuada con la permeabilidad in vivo.*

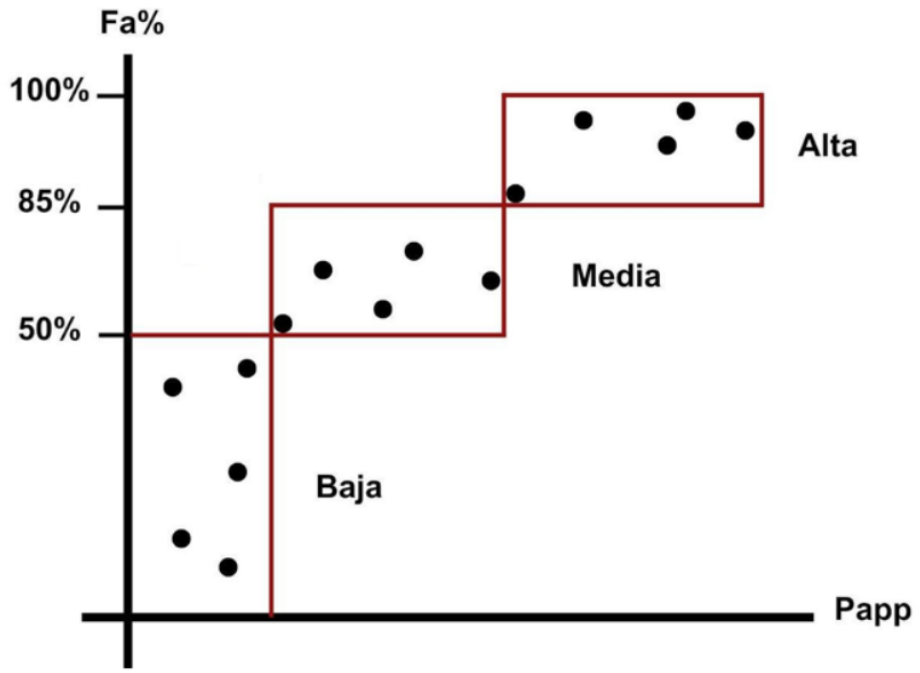

Figura 2. Gráfico de Papp vs Fa con zonas de baja, media y alta permeabilidad delimitadas.

Referencias:

- International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Biopharmaceutics Classification System-Based Biowaiver (M9) ICH Harmonised; Geneva, Switzerland: 2019. [https://database.ich.org/sites/default/files/M9_Guideline_Step4_2019_1116.pdf]

- Decreto exento Nº 17 de 2019 Minsal: ANEXO Nº 3: Guía técnica G-BIOF 02, guía para optar a bioexención de estudios de biodisponibilidad comparativa; Santiago, Chile. [https://bcn.cl/2m4rf]

- Decreto Exento Nº 27 de 2012 del Ministerio de Salud, que aprueba Norma Técnica Nº 131 nominada "Norma que define los criterios destinados a establecer la equivalencia terapéutica en productos farmacéuticos en Chile". [https://bcn.cl/2m4ko]