

Guía para el desarrollo de métodos con el sistema Agilent NanoDis

Autores

Dr. Emre Türeli
MyBiotech

Dra. Karen Krauel-Göllner
Agilent Technologies, Inc.

Introducción

Uno de los principales desafíos en el desarrollo de fármacos modernos es la escasa solubilidad en agua de numerosos candidatos a fármacos. Las formulaciones con nanopartículas son una atractiva solución para aumentar la biodisponibilidad de fármacos con baja solubilidad en agua. Los estudios de disolución son uno de los métodos más importantes que se usan para caracterizar, en condiciones *in vitro*, la biodisponibilidad *in vivo* esperada. Por consiguiente, es necesario un método de disolución eficiente durante el proceso de desarrollo de nanopartículas para facilitar la selección de las mejores formulaciones con una biodisponibilidad esperada superior. Esto es igualmente importante para el control de calidad durante las posteriores etapas del ciclo de vida del producto. Por lo tanto, la separación de fármaco disuelto y sin disolver es uno de los factores más importantes de todos los estudios de disolución.

La nanopartícula se considera una sustancia sin disolver y debe separarse del medio de disolución. Las metodologías de disolución actuales carecen de una separación eficiente de las nanopartículas del medio de disolución, independientemente del equipo que sea utilizado para los estudios de disolución. Además, los métodos de filtración estándar usados para las formulaciones convencionales no son suficientes para la separación de nanopartículas del medio de disolución durante el proceso de muestreo. La filtración a través de filtros con membrana es un método muy frecuentemente utilizado para la separación de API sin disolver. Suelen aplicarse filtros de jeringa con un tamaño de poro de 0,22 a 0,45 μm , pero esto también supone algunos inconvenientes. Las desventajas son que cualquier partícula de menos de 500 nm, en tamaño de partícula promedio, o bien obstruye y rompe el filtro, o pasa a través de él, con lo que se obtienen valores de disolución demasiado elevados. Existen filtros disponibles con tamaño de poro más pequeño, como los de 0,02 μm . Sin embargo, estos tienden a obstruirse rápidamente durante el proceso de muestreo, en particular si hay una elevada concentración de nanopartículas en el medio. Una separación ineficiente de las nanopartículas supondrá que las nanopartículas permanezcan en el medio de disolución después del proceso de separación, lo que a su vez producirá altas lecturas incorrectas para el análisis del perfil de disolución. En resumen, los procesos de disolución actuales utilizados en los laboratorios de desarrollo no son suficientes para predecir el rendimiento *in vivo* de las nanoformulaciones, debido a que los medios de filtración resultan inadecuados.

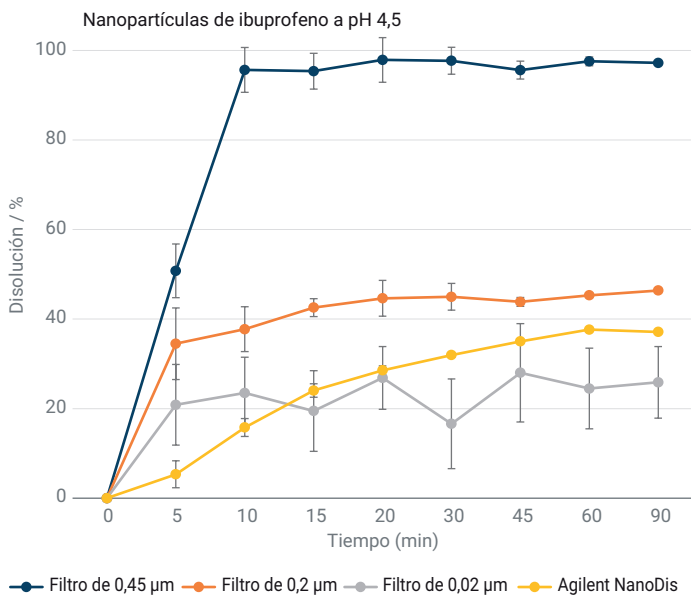


Figura 1. Perfiles de disolución de nanopartículas de ibuprofeno 200 mg/900 ml en tampón acetato a pH 4,5 utilizando diferentes filtros de jeringa (0,45 µm, 0,2 µm y 0,02 µm) y el sistema Agilent NanoDis.

El sistema de disolución Agilent NanoDis

El principio de filtración del sistema Agilent NanoDis se basa en filtración de flujo cruzado (CFF) combinada con un instrumento de disolución convencional, con el objetivo de automatizar el proceso de filtración. El sistema NanoDis utiliza las ventajas de CFF para separar las nanopartículas del medio de disolución. Dado que CFF es un sistema de filtración abierto, se evita la formación de un "sándwich" en el filtro, por lo que las nanopartículas no se fuerzan a pasar por el mismo, lo que usualmente suele suponer una obstrucción del filtro en un filtrado sin salida. Además, el tamaño de membrana de los filtros CFF se puede elegir de acuerdo con

el tamaño de las nanopartículas de la formulación. En el sistema NanoDis, el medio de disolución que contiene las nanopartículas se bombea a través de filtros CFF, donde el filtrado, libre de partículas, se recolecta con el Automuestreador para disolución Agilent 850-DS. La eficiencia de la filtración y el tiempo necesario para recolectar el filtrado dependen de la formulación y de la concentración de nanopartículas en el medio. Sin embargo, con el sistema NanoDis, incluso la mínima velocidad de filtración para las formulaciones más difíciles es superior a 10 ml/min, lo que genera suficiente volumen de muestra para el análisis cuantitativo de las muestras en disolución y permite intervalos de tiempo muy cortos.

Selección del tamaño y del tipo de membrana del filtro

Los tipos de filtro y los tamaños de poro de los filtros de flujo cruzado usados en los estudios de disolución se seleccionan de acuerdo con el tamaño y el tipo de nanopartícula, con el fin de asegurar una separación completa. Estas especificaciones permiten la determinación de un fármaco disuelto sin interferencias ocasionadas por nanopartículas sin disolver.

Existen disponibles numerosas membranas CFF con diferentes fases químicas. Es preciso realizar una prueba de validación del filtro para seleccionar la fase química adecuada de la membrana y evitar la adsorción de las nanopartículas y del API en el filtro. La validación del filtro se puede llevar a cabo con filtros de jeringa estándar con la misma fase química que las membranas CFF. Por el contrario, para la validación de un filtro de API, se disuelve el API a una concentración conocida en el medio de disolución y se analiza después del filtrado a través de los filtros de jeringa con un tamaño de poro, por ejemplo, de 0,45 µm. Se debe tener en cuenta que podría requerirse un tamaño de poro superior al de los filtros de jeringa para la validación del filtro de las formulaciones con nanopartículas.

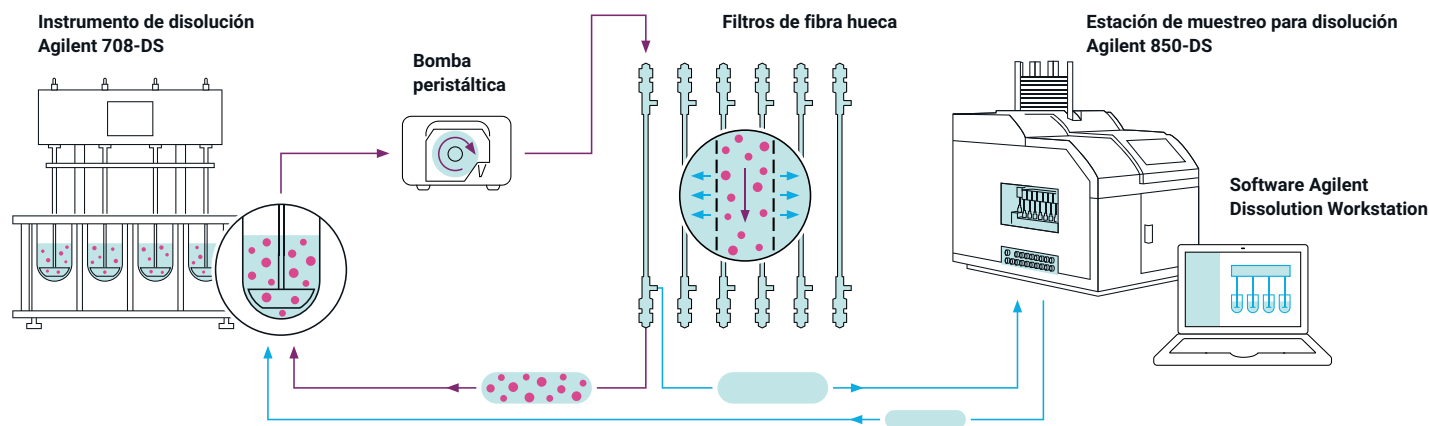


Figura 2. Representación en diagrama del sistema NanoDis mostrando el flujo direccional y la separación del API disuelto y las nanopartículas dispersadas empleando el instrumento de disolución Agilent 708-DS y la estación de muestreo para disolución Agilent 850-DS; control y documentación electrónica con el software Agilent Dissolution Workstation (DWS).

Las formulaciones con nanopartículas se dispersan en el medio de disolución a una concentración conocida y se hacen pasar a través de un filtro de jeringa con un tamaño de poro adecuado para garantizar el paso de las nanopartículas a través del filtro. El API se califica antes y después de la filtración para calcular la posible adsorción de las nanopartículas en el filtro.

Aunque el tamaño de partícula medio de la formulación del fármaco es la primera consideración, la distribución del tamaño de partícula y la distribución del tamaño de partícula en el medio de disolución son otros parámetros importantes que también hay que tener en cuenta. En formulaciones de partículas no homogéneas, el tamaño de las partículas más pequeñas presentes en la muestra puede estar muy alejado del tamaño de partícula medio, o viceversa (p. ej., el tamaño de partícula mayor de las partículas más grandes presentes en la muestra podría ser significativamente mayor que el tamaño de partícula medio). Además, especialmente una vez que las partículas se dispersan en medios *in vivo* relevantes tales como FeSSIF y FaSSIF, se puede formar una corona alrededor de la superficie de la partícula, aumentando el tamaño de partícula medio.

En general, se puede considerar la Tabla 1 para la selección del tamaño del poro de membrana adecuado:

Tabla 1. Selección del tamaño de poro de membrana.

Tamaño medio de partícula (nm)	Tamaño de poro de membrana (kDa)
< 10	10
10 a 25	50
25 a 50	100
50 a 150	300
>150	500

Si la distribución de tamaños de partícula es amplia o si hubiera una distribución bimodal con partículas más pequeñas presentes en la muestra, es necesario ajustar en consecuencia el tamaño de membrana del filtro CFF, considerando asimismo la fracción de partícula con el tamaño de partícula más pequeño. Otro parámetro importante es el tamaño de partícula de las micelas, que se forman en aquellos casos en los que se usan surfactantes en el medio de disolución. Las micelas del API disuelto también se pueden retener en las membranas CFF. Por lo tanto, es necesario seleccionar el tamaño de la membrana de acuerdo con el tamaño de la micela. En la sección de referencias¹ y en la página web de Repligen² se puede encontrar más información sobre validación de filtros.



Figura 3. El sistema Agilent NanoDis con filtros de flujo cruzado.

Equipo y parámetros del software

La optimización del equipo y de los parámetros del software forman parte del proceso de desarrollo de métodos de disolución para asegurar una separación eficiente de las nanopartículas del medio de disolución.

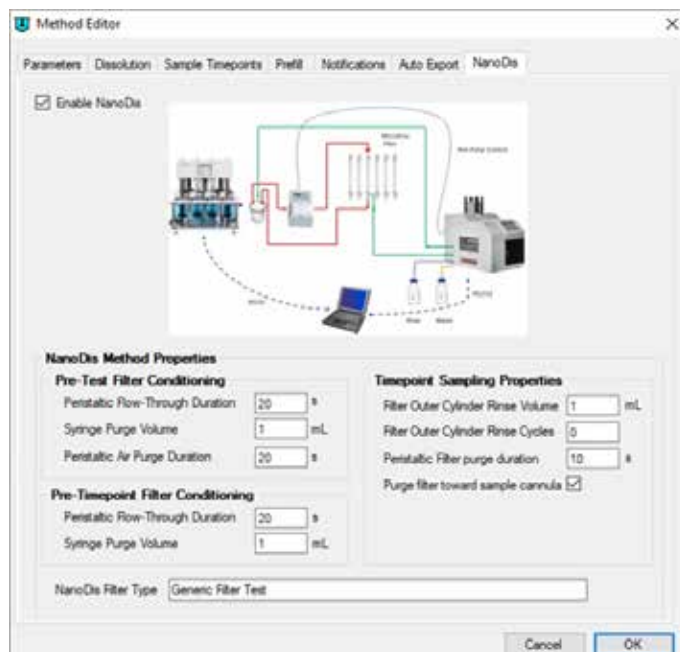


Figura 4. Captura de pantalla del software Agilent Dissolution Workstation, pestaña NanoDis.

El sistema NanoDis se controla con el software Agilent Dissolution Workstation (DWS). A continuación se describe la configuración de parámetros importantes para guiarle a través del proceso de desarrollo de métodos.

El método del sistema NanoDis se ejecuta en dos fases: la fase de pre-acondicionamiento del filtro, antes del inicio del ciclo de disolución, seguida del ciclo de disolución como tal. Cada intervalo de tiempo durante el ciclo de disolución viene precedido por un paso de pre-acondicionamiento adicional del filtro. Por tanto, una secuencia típica sería de este tipo:

Fase 1: Pre-acondicionamiento del filtro

Velocidad de la bomba: La velocidad de la bomba se ajusta manualmente en la bomba peristáltica. La presión transmembrana de la membrana CFF aumenta si lo hace el flujo, con lo que aumenta la permeación del filtrado. En resumen, la cantidad de la muestra filtrada recolectada puede aumentarse al aumentar el flujo.

Acondicionamiento del filtro antes de la prueba:

El acondicionamiento del filtro antes de la prueba se utiliza para humedecer los filtros con el medio de disolución actual. Comienza antes del inicio de la disolución y antes de la introducción del producto en el vaso de disolución. El medio de disolución que se filtra a través de las membranas CFF se dirige de vuelta al vaso de disolución, por lo que no hay pérdida de medio de disolución durante el acondicionamiento del filtro antes de la prueba. Al final del paso de acondicionamiento del filtro antes de la prueba, se purga el aire a través de las membranas CFF de modo que el medio de la disolución se dirige de vuelta al vaso en su totalidad.

El acondicionamiento del filtro antes de la prueba es importante en la preparación de las membranas CFF para el primer intervalo de tiempo. Si el acondicionamiento del filtro antes de la prueba no se aplica lo suficientemente, la cantidad de muestra se reduce para los primeros intervalos de tiempo. Es importante disponer del volumen de muestra correcto para obtener un cálculo preciso de los resultados de % disuelto.

Se pueden utilizar los siguientes parámetros de partida para el acondicionamiento del filtro antes de la prueba:

Operación	Ajuste recomendado
Duración del flujo a través de la bomba peristáltica Tiempo en segundos para bombear el medio a través del filtro	240 s
Volumen de purga de la jeringa Volumen en ml bombeado desde el cilindro exterior del filtro de flujo tangencial de vuelta al vaso	4 ml
Duración de la purga de aire de la bomba peristáltica La bomba peristáltica se revierte para vaciar el núcleo central del filtro de vuelta al vaso	50 s

Fase 2: Disolución

El ciclo de disolución comienza introduciendo la forma farmacéutica en los vasos. Cuando se utiliza el sistema NanoDis, la secuencia de prueba de la disolución se modifica ligeramente. Antes de cada tiempo de muestreo es necesario volver a acondicionar el filtro, lo que se completa justo antes de que el intervalo de tiempo comience.

Variables de acondicionamiento del filtro antes del intervalo de tiempo de muestreo

Operación	Ajuste recomendado
Duración del flujo a través de la bomba peristáltica Tiempo en segundos para bombear el medio a través del filtro	100 s
Volumen de purga de la jeringa Volumen en ml bombeado desde el cilindro exterior del filtro de flujo tangencial de vuelta al vaso	2 ml

Propiedades del muestreo en el intervalo de tiempo

Operación	Ajuste recomendado
Volumen de pérdida por cebado Volumen del tubo desde la punta de la cánula de muestreo hasta la aguja (850-DS) para permitir el muestreo en el tiempo correcto	3,5 ml
Volumen de muestra Volumen dispensado en la bandeja de muestra	De 1,0 a 5 ml (en función del análisis)
Volumen de lavado del cilindro exterior del filtro Volumen del medio de lavado que se bombeará al cilindro exterior del filtro; Volumen de purga total = volumen de purga + volumen de lavado del cilindro exterior del filtro	4 ml
Duración de la purga del filtro de la bomba peristáltica Después del muestreo, el medio de la muestra dentro del núcleo central del filtro se purga de vuelta al vaso. Este parámetro determina durante cuánto tiempo funcionará la bomba peristáltica para purgar el núcleo central. La dirección se controla mediante la casilla de verificación Purge filter toward sample cannula (Purgar filtro hacia la cánula de muestra).	30 s
Purga de la jeringa El ciclo de purga de la jeringa vacía el cilindro exterior del filtro y todos los tubos entre el filtro y el vaso en la ruta de flujo de la jeringa. Volumen de purga de la jeringa = volumen de lavado del cilindro exterior del filtro + volumen de purga.	4 ml
Ciclos de lavado del cilindro exterior del filtro Al término del tiempo de muestreo, el núcleo exterior del filtro se puede lavar con el medio de lavado. El valor se puede ajustar a cero si se desea evitar el ciclo de lavado.	De 1 a 3 veces con 4 ml

Recomendaciones y sugerencias

Uso de membranas por primera vez, limpieza y almacenamiento

Las membranas CFF se suministran en glicerol para mantener la estructura del poro. Se recomienda lavar las membranas con al menos 500 ml de agua purificada antes de su primer uso; como alternativa, se puede usar el medio de disolución para lavar las membranas. Se puede usar agua purificada, solución alcohólica (20 % de etanol o 20 % de isopropanol) o NaOH 0,1 N para limpiar las membranas entre un ciclo de disolución y otro, según la formulación de las nanopartículas. Es mejor almacenar las membranas a temperatura ambiente y en un medio de almacenamiento adecuado, como NaOH 0,1 N. De este modo se evita el crecimiento microbiano y que las fibras se sequen.

Prueba de integridad de la membrana

La prueba de integridad de las membranas CFF se controla con nanopartículas estándar con el tamaño de partícula medio deseado, y se ajusta al tamaño de poro de la membrana deseado en CFF. Las nanopartículas PLGA-Lumogen permiten visualizar la integridad de la membrana en ausencia o presencia de color en las muestras.

Prueba de obstrucción de membrana

La obstrucción de membrana CFF se determina realizando un experimento de disolución con agua y cuantificando la cantidad de muestra filtrada.

Referencias

1. Protocolo de validación de filtros: estación de muestreo para disolución Agilent 850-DS. *Resumen técnico de Agilent Technologies*, número de publicación 5991-3341EN, **2013**.
2. Herramienta de selección de Repligen 'Find a Spectrum Hollow Fiber Filter' (<https://www.repligen.com/resources/configurators/selection-tools/find-hollow-fiber-filter>).

www.agilent.com/chem

DE.1479976852

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2020
Impreso en EE. UU., 26 de octubre de 2020
5994-2347ES

