

# Guida allo sviluppo dei metodi del sistema Agilent NanoDis

## Autori

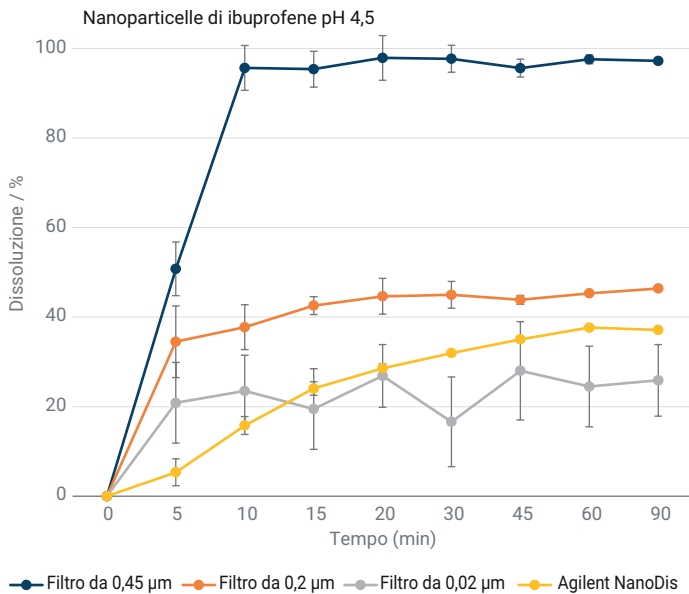
Dr. Emre Türeli  
MyBiotech

Dr. Karen Krauel-Göllner  
Agilent Technologies, Inc.

## Introduzione

Una delle principali sfide nello sviluppo moderno di farmaci è la scarsa solubilità in acqua di molti farmaci candidati. Le formulazioni in nanoparticelle rappresentano una soluzione attraente per aumentare la biodisponibilità dei farmaci scarsamente solubili in acqua. Gli studi di dissoluzione sono uno dei metodi più importanti usati per caratterizzare in condizioni *in vitro* la biodisponibilità prevista *in vivo*. Per facilitare la scelta di formulazioni principali con una maggiore biodisponibilità prevista è quindi necessario un metodo di dissoluzione efficiente durante il processo di sviluppo delle nanoparticelle. Tale metodo è importante anche per il controllo qualità nelle fasi successive del ciclo di vita del prodotto. La separazione del farmaco disciolto da quello non disciolto è quindi uno dei fattori più importanti in tutti gli studi di dissoluzione.

La nanoparticella è considerata una sostanza non disciolta e deve essere separata dal mezzo di dissoluzione. Gli attuali metodi di dissoluzione risentono della separazione inefficiente delle nanoparticelle dal mezzo di dissoluzione, indipendentemente dalla strumentazione usata per gli studi di dissoluzione. Inoltre, i metodi di filtrazione standard usati per le formulazioni tradizionali non sono sufficienti per la separazione delle nanoparticelle dal mezzo di dissoluzione durante il processo di campionamento. La filtrazione attraverso filtri a membrana è un metodo molto comune per la separazione del principio attivo non disciolto. Vengono utilizzati anche filtri per siringhe con pori di 0,22 o 0,45  $\mu\text{m}$ , ma anch'essi presentano dei problemi. Gli svantaggi sono che tutte le particelle di dimensioni inferiori a 500 nm in media o ostruiscono e rompono il filtro o passano direttamente attraverso di esso, determinando valori di dissoluzione troppo elevati. Sono disponibili filtri con dimensioni dei pori inferiori, come 0,02  $\mu\text{m}$ . Questi, però, tendono a ostruirsi rapidamente durante il processo di campionamento, specialmente nel caso in cui la concentrazione di nanoparticelle nel mezzo sia elevata. Una separazione inefficiente delle nanoparticelle farà sì che esse restino nel mezzo di dissoluzione dopo il processo di separazione, il che a sua volta porterà a letture erroneamente elevate nell'analisi del profilo di dissoluzione. Riassumendo, i processi di dissoluzione attualmente usati nei laboratori di sviluppo non sono sufficienti per prevedere le prestazioni *in vivo* delle nanoformulazioni in quanto i mezzi di filtrazione sono inadeguati.



**Figura 1.** Profili di dissoluzione di nanoparticelle di ibuprofene 200 mg/900 mL in tampone acetato pH 4,5 usando diversi filtri per siringhe (0,45 μm, 0,2 μm e 0,02 μm) e il sistema NanoDis Agilent.

## Sistema di dissoluzione Agilent NanoDis

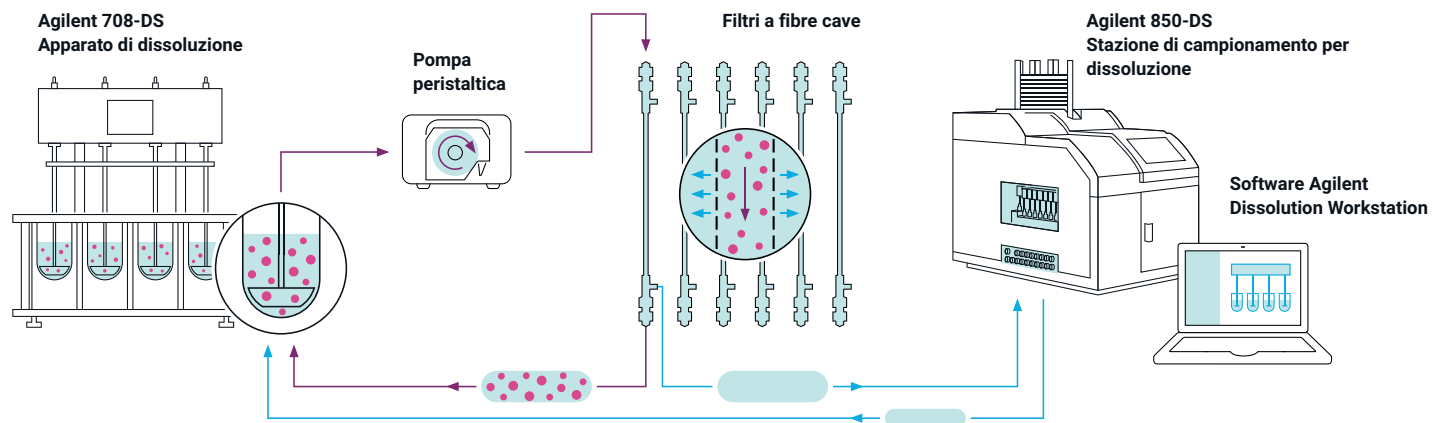
Il principio del sistema Agilent NanoDis si basa sulla filtrazione a flusso incrociato (TFF) combinata con un apparato di dissoluzione tradizionale allo scopo di automatizzare il processo di filtrazione. Il sistema NanoDis sfrutta i vantaggi della TFF per separare le nanoparticelle dal mezzo di dissoluzione. Poiché la TFF è un sistema di filtrazione aperto, viene impedita la formazione di un residuo di filtrazione e le nanoparticelle non sono forzate nel filtro, cosa che spesso ne determina l'ostruzione in una filtrazione a flusso frontale. Inoltre, le dimensioni della membrana dei filtri TFF possono essere scelte in base alle dimensioni delle

nanoparticelle della formulazione. Nel sistema NanoDis, il mezzo di dissoluzione contenente le nanoparticelle viene pompato attraverso i filtri TFF dove il filtrato, privo di particelle, viene raccolto mediante la stazione di campionamento per dissoluzione Agilent 850-DS. L'efficienza della filtrazione e il relativo tempo necessario per raccogliere il filtrato dipendono dalla formulazione e dalla concentrazione delle nanoparticelle nel mezzo. Con il sistema NanoDis, anche la velocità di filtrazione più bassa per le formulazioni problematiche è comunque superiore a 10 mL/min, il che genera un volume di campione sufficiente per l'analisi quantitativa dei campioni disciolti e permette intervalli temporali molto brevi.

## Sceita della dimensione e del tipo di membrana del filtro

I tipi di filtro e le dimensioni dei pori dei filtri a flusso tangenziale usati negli studi di dissoluzione sono scelti in base alla dimensione e al tipo delle nanoparticelle, e al fine di garantire una separazione completa. Queste specifiche permettono la determinazione del farmaco disciolto senza interferenze causate dalle nanoparticelle non disciolte.

Sono disponibili molte membrane TFF con composizione chimica diversa. Per scegliere la composizione chimica corretta della membrana è necessario un test di validazione del filtro per impedire l'adsorbimento delle nanoparticelle e del principio attivo sul filtro stesso. La validazione del filtro può essere eseguita con i filtri per siringa standard, che hanno la stessa composizione chimica delle membrane TFF. Al contrario, per la validazione del filtro di un principio attivo, il principio attivo a una concentrazione nota viene disciolto in un mezzo di dissoluzione e analizzato dopo filtrazione attraverso filtri per siringhe con una dimensione dei pori, ad esempio, di 0,45 μm. Si osserva che, per la validazione del filtro di formulazioni in nanoparticelle, potrebbe essere necessaria una dimensione maggiore dei pori dei filtri per siringhe.



**Figura 2.** Rappresentazione grafica del sistema NanoDis che mostra il flusso direzionale e la separazione del principio attivo disciolto e delle nanoparticelle disperse usando l'apparato di dissoluzione Agilent 708-DS conforme all'USP e la stazione di campionamento per dissoluzione 850-DS, utilizzata e documentata elettronicamente usando il software Agilent Dissolution Workstation (DWS).

Le formulazioni in nanoparticelle sono disperse nel mezzo di dissoluzione a una concentrazione nota e poi fatte passare attraverso un filtro per siringhe con dimensione dei pori appropriata a garantirne il passaggio. Il principio attivo prima e dopo la filtrazione è utile per calcolare il possibile adsorbimento delle nanoparticelle sul filtro.

Pur essendo la dimensione media delle particelle della formulazione del farmaco la considerazione primaria, la distribuzione delle dimensioni delle particelle e la distribuzione delle dimensioni delle particelle nel mezzo di dissoluzione sono altri parametri importanti da considerare. In formulazioni con particelle non omogenee, le dimensioni delle particelle più piccole presenti nel campione possono essere ampiamente inferiori alle dimensioni medie delle particelle o viceversa (ossia le dimensioni più elevate delle particelle più grandi presenti nel campione possono essere significativamente superiori alle dimensioni medie delle particelle). Inoltre, specialmente quando le particelle sono disperse in un mezzo pertinente *in vivo*, come FeSSIF e FaSSIF, si può formare una corona intorno alla loro superficie, che ne aumenta la dimensione media.

In generale, per scegliere la dimensione corretta dei pori della membrana si può considerare la Tabella 1:

**Tabella 1.** Scelta delle dimensioni dei pori della membrana.

Dimensione media delle particelle (nm)	Dimensione dei pori della membrana (kDa)
<10	10
Tra 10 e 25	50
Tra 25 e 50	100
Tra 50 e 150	300
>150	500

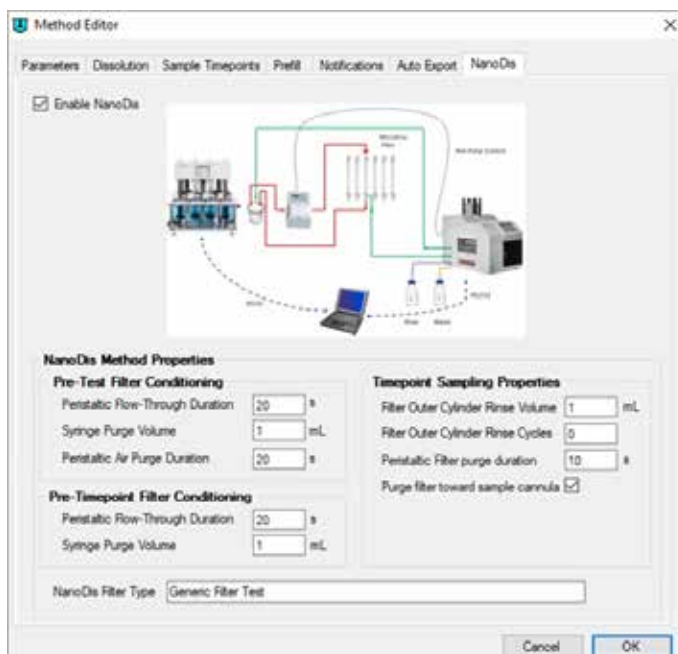
Se la distribuzione delle dimensioni delle particelle è ampia o se vi è una distribuzione bimodale con la presenza di particelle più piccole nel campione, le dimensioni della membrana del filtro TFF devono essere regolate di conseguenza, tenendo conto anche della frazione di particelle con le dimensioni più piccole. Un altro parametro importante è la dimensione delle particelle delle micelle, che si formano nei casi in cui nel mezzo di dissoluzione siano usati tensioattivi. Le micelle di principio attivo disciolto possono essere trattenute anche dalle membrane TFF. La dimensione della membrana deve quindi essere scelta in base alla dimensione delle micelle. Maggiori informazioni sulla validazione del filtro si possono trovare nella sezione dei riferimenti<sup>1</sup> e sul sito web di Repligen.<sup>2</sup>



**Figura 3.** Sistema Agilent NanoDis con filtri a flusso tangenziale.

## Parametri della strumentazione e del software

L'ottimizzazione dei parametri della strumentazione e del software fa parte del processo di sviluppo del metodo di dissoluzione per garantire una separazione efficiente delle nanoparticelle dal mezzo di dissoluzione.



**Figura 4.** Schermata del software Agilent Dissolution Workstation, scheda NanoDis.

Il sistema NanoDis è controllato dal software Agilent Dissolution Workstation (DWS). Sono indicate di seguito le impostazioni dei parametri importanti per navigare attraverso il processo di sviluppo di metodi.

Il metodo del sistema NanoDis viene eseguito in due fasi: la fase di precondizionamento del filtro prima dell'inizio della dissoluzione e la dissoluzione vera e propria. Ogni punto temporale del processo di dissoluzione è preceduto da un passaggio aggiuntivo di precondizionamento del filtro. Una sequenza tipica avrebbe quindi il seguente aspetto:

### Fase 1: precondizionamento del filtro

**Velocità della pompa:** la velocità della pompa viene regolata manualmente sulla pompa peristaltica. La pressione transmembrana delle membrane TFF aumenta all'aumentare del flusso, il che determina un aumento della permeazione del filtrato. Riassumendo, la quantità raccolta di campione filtrato può essere aumentata aumentando il flusso.

**Condizionamento pretest del filtro:** il condizionamento pretest del filtro viene usato per bagnare i filtri con il mezzo di dissoluzione attuale. Inizia prima dell'inizio della dissoluzione e prima dell'introduzione del prodotto nel recipiente di dissoluzione. Il mezzo di dissoluzione filtrato attraverso le membrane TFF viene diretto nuovamente verso il recipiente di dissoluzione per cui non vi sono perdite di mezzo di dissoluzione durante il condizionamento pretest del filtro. Al termine del passaggio di condizionamento pretest del filtro, l'aria viene spurgata attraverso le membrane TFF in modo che tutto il mezzo di dissoluzione sia diretto nuovamente nel recipiente.

Il condizionamento pretest del filtro è importante per la preparazione delle membrane TFF per il primo punto temporale. Se il condizionamento pretest del filtro non viene applicato in modo sufficiente, la quantità di campione è ridotta per i primi punti temporali. Il volume corretto di campione è importante per un calcolo accurato dei risultati di % disciolta.

Per il condizionamento pretest del filtro si possono usare i seguenti parametri iniziali:

Operazione	Impostazione raccomandata
<b>Durata del flusso passante della pompa peristaltica</b> Tempo in secondi per raggiungere il mezzo della pompa attraverso il filtro	240 s
<b>Volume di spurgo della siringa</b> Volume in mL pompato fuori dal cilindro esterno del filtro a flusso tangenziale nel recipiente	4 mL
<b>Durata dello spurgo d'aria nella pompa peristaltica</b> La pompa peristaltica viene invertita per svuotare il nucleo centrale del filtro nel recipiente	50 s

### Fase 2: Dissoluzione

Il processo di dissoluzione inizia introducendo la forma di dosaggio nei recipienti. Quando si usa il sistema NanoDis, la sequenza del test di dissoluzione è leggermente modificata. Prima di ogni punto temporale, è necessario ricondizionare il filtro, operazione completata subito prima del punto temporale richiesto.

### Variabili di condizionamento del filtro prima del punto temporale

Operazione	Impostazione raccomandata
<b>Durata del flusso passante della pompa peristaltica</b> Tempo in secondi per raggiungere il mezzo della pompa attraverso il filtro	100 s
<b>Volume di spurgo della siringa</b> Volume in mL pompato fuori dal cilindro esterno del filtro a flusso tangenziale nel recipiente	2 mL

### Proprietà di campionamento del punto temporale

Operazione	Impostazione raccomandata
<b>Volume perso all'adescamento</b> Volume del tubo dalla punta della cannula di campionamento all'ago (850-DS) che permette di correggere il campionamento per il tempo	3,5 mL
<b>Volume di campione</b> Volume erogato nel vassoio portacampioni	da 1,0 a 5 mL (a seconda dell'analisi)
<b>Volume di lavaggio del cilindro esterno del filtro</b> Volume del mezzo di lavaggio che sarà pompato nel cilindro esterno del filtro; Volume totale di spurgo = volume di spurgo + volume di lavaggio del cilindro esterno del filtro	4 mL
<b>Durata dello spurgo del filtro peristaltico</b> Dopo il campionamento, il mezzo del campione nel nucleo centrale del filtro viene spurgato nuovamente nel recipiente. Il parametro determina per quanto tempo la pompa peristaltica funzionerà per spurgare il nucleo centrale. La direzione è controllata dal filtro di spurgo verso la casella di controllo della cannula di campionamento.	30 s
<b>Spurgo della siringa</b> Il ciclo di spurgo della siringa svuota il cilindro esterno del filtro e tutti i tubi tra il filtro e il recipiente nel percorso del flusso della siringa. Volume di spurgo della siringa = volume di lavaggio del cilindro esterno del filtro + volume di spurgo	4 mL
<b>Cicli di lavaggio del cilindro esterno del filtro</b> Al termine del punto temporale, il nucleo esterno del filtro può essere lavato usando il mezzo di lavaggio. Il valore può essere impostato su zero per evitare il ciclo di lavaggio.	da 1 a 3 volte con 4 mL

## Suggerimenti e trucchi

### Primo utilizzo della membrana, pulizia e conservazione

Le membrane TFF vengono spedite immerse in glicerolo per mantenere la struttura dei pori. Si raccomanda di lavare le membrane con almeno 500 mL di acqua purificata prima del primo utilizzo; in alternativa, per lavare le membrane può essere usato il mezzo di dissoluzione. Acqua purificata, soluzione alcolica (etanolo al 20% o isopropanolo al 20%) o NaOH 0,1 N possono essere usati per la pulizia delle membrane tra un processo di dissoluzione e l'altro a seconda della formulazione delle nanoparticelle. È meglio conservare le membrane a temperatura ambiente e in un mezzo di conservazione idoneo, ad esempio NaOH 0,1 N. Ciò impedisce la crescita microbiologica e impedisce alle fibre di asciugarsi.

### Test di integrità della membrana

Il test di integrità delle membrane TFF è controllato mediante nanoparticelle standard con dimensioni medie desiderate ed è regolato in base alla dimensione dei pori della membrana desiderata per la TFF. Le nanoparticelle PLGA-Lumogen permettono la visualizzazione dell'integrità della membrana in base all'assenza o presenza di colore nei campioni.

### Test di ostruzione della membrana

L'ostruzione della membrana TFF è determinata conducendo un esperimento di dissoluzione con acqua e quantificando la quantità di campione filtrato.

## Bibliografia

1. Filter Validation Protocol: Agilent 850-DS Dissolution Sampling Station. *Nota tecnica di Agilent Technologies*, numero pubblicazione 5991-3341EN, **2013**.
2. Strumento di selezione Repligen "Find a Spectrum Hollow Fiber Filter" (<https://www.repligen.com/resources/configurators/selection-tools/find-hollow-fiber-filter>).

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

DE.1479976852

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2020  
Stampato negli Stati Uniti, 26 ottobre 2020  
5994-2347ITE

