

MODELY *IN VITRO* – *IN VIVO* VE VÝVOJI LÉČIV

DAVID VETCHÝ^a, MARIE KOPECKÁ^b,
MARTINA VETCHÁ^c a ALEŠ FRANC^a

^a Ústav technologie léků, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, ^b Lékárna na poliklinice, Kollárova 22, Svítavy, ^c Lékárna na Mendlově náměstí, Mendlovo náměstí 14, Brno

vetchy@email.cz

Došlo 1.10.12, přepracováno 3.5.13, přijato 25.6.13.

Klíčová slova: Korelace *in vitro* – *in vivo*, úrovně korelace *in vitro* – *in vivo*, biofarmaceutický klasifikační systém, disoluční metody

Obsah

1. Úvod
2. Korelace *in vitro* – *in vivo* a její úrovně
 - 2.1. Korelace na úrovni A
 - 2.2. Korelace na úrovni B
 - 2.3. Korelace na úrovni C
 - 2.4. Vícenásobná korelace na úrovni C
 - 2.5. Korelace na úrovni D
3. Postup vytvoření a hodnocení korelace *in vitro* – *in vivo* na úrovni A
4. Důležité faktory pro stanovení korelací *in vitro* – *in vivo*
5. Vybrané studie zabývající se korelacemi *in vitro* – *in vivo*
6. Závěr

1. Úvod

Farmaceutický průmysl hledá v současnosti intenzivně cesty, jak snižovat náklady na vývoj nových i generických léčiv. Jednou z cest je využití metod korelace *in vitro* – *in vivo* (IVIVC). Tyto metody umožňují předpovídat absorpci léčiva v živém organismu *in vivo* na základě dat, která byla získána za pomoci disoluce v podmínkách *in vitro*. Vhodně zvládnutá metodika pak může sloužit i jako náhrada klinických studií biologické dostupnosti, na jejichž základě lze požádat příslušné národní autority o vynechání zkoušky bioekvivalence. IVIVC je proto v současnosti pravděpodobně nejdůležitějším prostředkem k nahrazení nákladných klinických zkoušek. Zavedení metod IVIVC přispělo i ke zkvalitnění bezpečnosti a kontroly léčiv, spočívající v nalezení metod disoluce

s vysokou rozlišovací schopností. Tyto metody pak, na základě farmakokinetiky, umožňují zavést i cílené postupy při vývoji lékové formy již ve stádiu formulace a zároveň umožní i vysoce selektivní kontrolu kvality.

IVIVC je ve své podstatě modelový, matematicky zdůvodněný vztah mezi parametry lékové formy, získanými v podmínkách *in vitro*, vůči parametrům, nalezeným v podmínkách *in vivo*¹. Parametry *in vitro* jsou zde představovány hodnotami liberace léčiva na základě vhodné zvolené disoluční metody. Charakteristickými hodnotami *in vivo* jsou zpravidla plazmatické koncentrace léčivé látky v čase. Získaná data *in vitro* a *in vivo* jsou poté zpracována ke stanovení lineárních nebo nelineárních korelací mezi hodnotami *in vitro* vs. *in vivo*.

IVIVC nachází své uplatnění zejména u perorálních přípravků s prodlouženým uvolňováním, kde je absorpce léčiva více závislá na jeho liberaci, což je pro nalezení korelace výhodné. Je jí však možné využít i u léků s okamžitým uvolňováním. Pro ostatní systémy podání jsou metody IVIVC méně vypovídající. Pro další výzkum je u těchto dalších systémů potřebné vyvinout metodologii a standardy, které by spočívaly v nalezení vysoce rozlišující disoluční zkoušky *in vitro* ve vztahu k permeabilitě léčiva v podmínkách *in vivo*.

Cílem příspěvku je shrnout současné poznatky týkající se různých úrovní IVIVC ve vztahu ke specifickým profilům liberace u perorálních přípravků.

2. Korelace *in vitro* – *in vivo* a její úrovně

Pojetí úrovně korelace je založené na různé schopnosti jednotlivých úrovní vyjádřit úplný plazmatický profil léčiva.

2.1. Korelace na úrovni A

Jedná se o nejspolehlivější úroveň korelace a bývá obvykle lineární. Křivka disoluce *in vitro* a křivka absorpce *in vivo* se mohou překrývat přímo (jsou v poměru 1 : 1) nebo je lze překrýt s použitím vhodného měřítka². Množství absorbované léčivé látky může být vypočítáno pomocí matematických operací jako je Wagner-Nelsonův vztah odvozený z jednodílného modelu (vzorec 1), Loo-Riegelmanův vztah pro jedno až tříkompartmentový model vyžadující už intravenózní data (vzorec 2). Dále

$$(X_a)_T = VC_T + k_e V \int_0^T C(t) dt$$

Vzorec 1. Wagner-Nelsonův vztah⁸

$$(X_a)_T = V \cdot C_T + V \cdot k_e \int_0^T C(t) dt + V \cdot k_{12} e^{-k_2 T} \int_0^T C(t) e^{k_2 t} dt$$

Vzorec 2. Loo-Riegelmanův vztah pro dvoukompartmentový model⁸

může být zvolena metoda numerické dekonvoluce. Účelem korelace na úrovni A je definovat přímý vztah mezi daty *in vitro* a *in vivo* tak, aby disoluční křivka mohla sloužit přímo jako náhražka křivky plazmatické koncentrace *in vivo*. Úroveň A se uplatňuje zejména u léčiv s lineární farmakokinetikou v lékové formě s prodlouženým uvolňováním léčiva³. U přípravku s okamžitým uvolňováním je tato metoda obtížněji využitelná. Korelace na úrovni A dokáže na základě disoluce *in vitro* i určit, zda určitá změna ve výrobě lékové formy nemá vliv na její chování *in vivo*. Korelace na úrovni A tak může sloužit i jako velmi dobrá kontrola jakosti.

2.2. Korelace na úrovni B

Využívá principů statistické momentové analýzy. I zde se porovnává rychlost disoluce s plazmatickou hladinou, avšak nikoliv „bod po bodu“. Využívá se zde střední doba disoluce přípravku *in vitro*. Je to doba, za kterou se léčivo rozpustí v disolučních podmínkách *in vitro*. Střední doba disoluce přípravku *in vitro* se porovnává buď se střední retenční dobou *in vivo* nebo se střední dobou disoluce *in vivo*. Ačkoli IVIVC úrovně B využívá všechna data *in vitro* a *in vivo*, není považována za vícebodovou korelaci, protože více různých křivek *in vitro* může mít podobné hodnoty střední retenční doby *in vivo*. Tato úroveň tedy nevyjadřuje aktuální křivku plazmatické koncentrace *in vivo*, a proto nelze spoléhat, že korelace na úrovni B předpoví účinek změněného přípravku, změny výroby, změny složení apod. Data *in vitro* z této úrovně korelace nemohou být použita pro nastavení změn ve standardech kontroly jakosti a je nejméně vhodná pro účely kvality kontroly⁴. Korelace na úrovni B je vyžadována zejména při registraci, resp. tvorbě dokumentace ohledně monitoringu bezpečnosti léčiva⁵.

2.3. Korelace na úrovni C

Stanovuje vztah mezi konkrétním farmakokinetickým parametrem *in vivo* a dobou nezbytnou pro disoluci daného množství léčiva (např. $t_{50\%}$, $t_{90\%}$) *in vitro*. Parametrem *in vivo* zde bývá plocha pod křivkou plazmatických koncentrací léčivé látky (AUC), maximální plazmatická koncentrace (c_{\max}) nebo čas (t_{\max}), který uběhne mezi podáním léčivého přípravku a okamžikem, kdy je pozorována c_{\max} (cit.³). Korelace na úrovni C neodráží kompletní tvar křivky plazmatické koncentrace, což je kritický faktor určující účinnost léčivých přípravků s prodlouženým uvolňováním

léčivé látky. Jedná se o úroveň korelace, která stanoví jen částečný vztah mezi absorpcí a disolucí, a proto je korelace na úrovni C limitována v předpovědi účinku léčiva *in vivo*. Podobně jako u korelace na úrovni B i u této úrovně korelace nemohou být výsledná data použita při změnách výroby a při nastavení standardů kontroly jakosti. Korelace na úrovni C může být užitečná v počátečních fázích vývoje přípravku, kdy jsou vybírány pilotní přípravky. Při použití korelace na úrovni C nelze zpravidla vynechat bioekvivalenční studie *in vivo*².

2.4. Vícenásobná korelace na úrovni C

Uvádí do vztahu jeden nebo několik farmakokinetických parametrů (c_{\max} , AUC nebo jiné vhodné parametry) s množstvím uvolněné léčivé látky v několika časových bodech disolučního profilu. Tento vztah může být určen v každém časovém bodě pro daný parametr tak, že vyhodnotí vliv jakékoli změny v disoluci na vlastnosti léčiva *in vivo*. Korelace má být založena nejméně na třech bodech disoluce z počáteční, střední a koncové fáze disolučního profilu. Je-li stanovena vícenásobná korelace na úrovni C, lze vynechat bioekvivalenční studii⁶.

2.5. Korelace na úrovni D

Tato úroveň vznikla jako odpověď na otázku, jak vhodně matematicky modelovat kinetiku léčiv s okamžitým uvolňováním, kde jsou výsledky disoluce prakticky nezávislé na nalezených plazmatických hladinách léčiva. Metoda se často popisuje jako „vzájemný vztah“ a používá se pro ni termín „*in vitro* – *in vivo* relationship“ (IVIVR). Jedná se o volnější vyjádření vzájemného poměru, nikoliv o nalezení vzájemné korelace mezi parametry *in vivo* a *in vitro*. Teoretickým nelineárním modelem IVIVR se v 90. letech zabýval Polli, jehož vztah se uplatňuje zpravidla v časných fázích vývoje léku (vzorec 3, cit.³). Vztah vychází z jednoduchého poměru mezi kinetikou absorpce a disolucí.

$$(X_a)_T = \frac{1}{F_{\text{inf}}} \left(1 - \frac{\alpha}{\alpha - 1} [1 - D] + \frac{1}{\alpha - 1} [1 - D]^\alpha \right)$$

Vzorec 3. Polliho rovnice³

Podle FDA je za nejvíce informativní a doporučovanou považována IVIVC na úrovni A. V případě možnosti se stanoví vícenásobná korelace na úrovni C nebo alespoň korelace na úrovni C, případně korelace na úrovni B a nakonec korelace na úrovni D (cit.⁵). Porovnání jednotlivých parametrů *in vivo* a *in vitro* používaných na jednotlivých úrovních uvádí tab. I.

Tabulka I

Posuzované parametry na jednotlivých úrovních korelace

Úroveň	Parametr <i>in vitro</i>	Parametr <i>in vivo</i>
A	disoluční křivka	absorpční křivka
B	střední disoluční rychlost	průměrné kinetické parametry
C	množství uvolněné látky v čase	jednotlivé kinetické parametry
D	frakce z uvolněného léčiva	jednotlivé kinetické parametry

3. Postup vytvoření a hodnocení korelace *in vitro* – *in vivo* na úrovni A

Vytvoření modelu IVIVC vyžaduje data *in vitro* minimálně ze dvou přípravků (doporučováno je ze tří a více) s různou rychlostí uvolňování, např. rychlou, střední a pomalou (cit.¹). Tyto přípravky s rozdílnou rychlostí disoluce *in vitro* se pak porovnávají s odpovídajícími křivkami plazmatických koncentrací v závislosti na čase. Rychlosti uvolňování by se měly dostatečně lišit, např. o 10 % (cit.⁷). Disoluční profily se srovnávají pomocí faktoru podobnosti a rozdílnosti. Oba faktory se vypočítají na základě procentuální odchylky mezi dvěma disolučními křivkami v každém časovém odběrovém bodě *in vitro*. Faktor podobnosti v rozmezí 50 až 100 znamená statisticky významnou podobnost a faktor rozdílnosti v rozmezí 0 až 15 znamená statistickou rozdílnost v podobnosti disolučních křivek porovnávaných přípravků¹. Přípravky s různými rychlostmi uvolňování se obvykle vyrábí změnou některých parametrů (např. množství pomocných látek, velikostí částic léčivé látky, velikosti lisovací síly při lisování tablet apod.). Kvalitativní složení přitom zůstává stejné. Potřebná data pochází z raných nebo pozdějších fází vývoje léku, např. ze studie biologické dostupnosti nebo studie *in vivo* prováděné speciálně pro získání IVIVC⁸.

Podmínky disoluční zkoušky

Podmínky disoluční zkoušky je třeba volit tak, aby se korelace mezi disolučním profilem *in vitro* a profilem absorpce *in vivo* blížila poměru 1 : 1. Poté se disoluční podmínky již nesmějí měnit⁸. U lékových forem s okamžitým uvolňováním se nejčastěji používá přístroj s pádlem

(obvykle pro tablety) nebo s košíčkem (obvykle pro tobolky). Rychlost rotace pádel u disoluce dávkových forem leží v rozsahu 50–75 ot/min a pro zkoušení suspenzí 25 ot/min. Pro košíčky se doporučuje 75–100 ot/min (cit.¹). Snížení nebo zvýšení otáček je vhodné, pokud profily *in vitro* lépe odrazí profil *in vivo*⁹. Použití přístroje s vratným válcem je výhodné, pokud se během disoluční zkoušky mění pH média, např. u enterosolventních léků. Přístroj s průtokovou celou se používá zejména pro lékové formy s prodlouženým uvolňováním, které obsahují léčivou látku s velmi omezenou rozpustností⁹. Přístroj s pádlem, diskem a rotujícím válcem je určen pro zkoušení transdermálních lékových forem⁶. Pro volbu disolučních médií a stanovení úrovně IVIVC je nutné zvážit, do jaké třídy biofarmaceutického klasifikačního systému (BCS) léčivo patří (tab. II). Je přitom nutné znát jeho rozpustnost a permeabilitu. IVIVC se obvykle stanovuje pro vysoce permeabilní léčiva 1. a 2. třídy BCS.

Léčiva 1. třídy BCS

Léčiva zařazená do 1. třídy BCS se vyznačují vysokou rozpustností a vysokou permeabilitou. Léčivo v této třídě je dobře absorbováno, přestože jeho systémová dostupnost může být nízká vzhledem k efektu prvního průchodu játry. Po podání těchto léčiv prochází léková forma rychle do žaludku, kde se rozpadá. Proto je při disoluci vhodné použít média napodobující žaludeční podmínky⁹. Pro většinu léčiv 1. třídy jsou výchozími médii čištěná voda a umělá žaludeční šťáva bez enzymů¹. U želatinyvých tobolek se do média přidávají enzymy (obvykle pepsin), které zajistí vhodnou disoluci obalu tobolky. U slabě kyselých léčiv se kvůli omezené disoluci v kyselém prostředí používá slabě alkalická umělá střevní

Tabulka II

Předpoklady IVIVC pro léčiva s okamžitým uvolňováním na základě tříd BCS¹

Třída	Rozpustnost	Permeabilita	Předpoklady IVIVC pro léčiva s okamžitým uvolňováním
1	vysoká	vysoká	IVIVC lze stanovit, pokud je rychlost disoluce nižší než rychlost žaludečního vyprazdňování, jinak je IVIVC omezena nebo nelze stanovit
2	nízká	vysoká	IVIVC lze stanovit, pokud je rychlost disoluce podobná rychlosti rozpouštění <i>in vivo</i> a pokud není dávka léčiva velmi vysoká
3	vysoká	nízká	IVIVC lze určit pouze při určité rychlosti absorpce (permeability)
4	nízká	nízká	IVIVC lze stanovit pouze v omezených případech nebo nelze stanovit

šťáva bez enzymů. Pokud je stanovena IVIVC na úrovni A a disoluční zkouška je provedena ve třech různých médiích, jejichž pH napodobuje podmínky gastrointestinálního traktu (např. o pH 1,2, 4,5 a 6,8), může být disoluce *in vitro* použita jako náhrada testů biologické dostupnosti *in vivo* a bioekvivalenčních studií¹⁰.

Léčiva 2. třídy BCS

Léčiva, která jsou zařazena do 2. třídy BCS, mají nízkou rozpustnost a vysokou permeabilitu. Uvolnění léčivé látky z lékové formy *in vivo* ovlivňuje absorpci, která je u této třídy pomalejší než u 1. třídy. U disolučních zkoušek slabě zásaditých léčiv se jako médium volí umělá žaludeční šťáva bez enzymů, do které se přidávají tenzidy (např. Triton X), napodobující podmínky „nalačno“. Přítomnost tenzidů v žaludku je důležitá zejména pro rozpouštění špatně rozpustných kyselin¹¹. U slabě kyselých léčiv se disoluce obvykle provádí ve střevní tekutině simulující stav nalačno a po jídle, která rovněž využívá zvýšeného smáčení povrchu léčiv a jejich micelární solubilizaci žlučovými kyselinami z těchto médií¹². Bioekvivalenční studie je možné v USA vynechat v případě použití metod IVIVC u kyselých léčiv 2. třídy BCS, která sice mají nízkou rozpustnost žaludku, ale v tenkém střevě jsou dobře rozpustná¹⁰.

Léčiva 3. třídy BCS

Léčiva 3. třídy BCS mají nízkou permeabilitu, která je pro absorpci léčiva rozhodující. Pokud se alespoň 85 % jednotkové dávky léčiva rozpustí během 15 min v rozsahu pH zpravidla 1–8, jsou odchylky v absorpci způsobeny spíše průchodem v gastrointestinálním traktu nebo permeabilitou membrány než vlivem lékové formy¹³. U disolučních zkoušek je vhodné použít vodná média¹⁴. I když je permeabilita léčiv 3. třídy nízká, je v mnoha případech dostatečná, aby léčivo dosáhlo potřebné terapeutické koncentrace v krvi. IVIVC je zde vhodná zejména pro lékové formy s okamžitým uvolňováním. Pokud permeabilita

limituje absorpci, IVIVC nemůže být stanovena. Výběr disoluční metody je jednodušší než u léčiv 2. třídy nebo u přípravků s prodlouženým uvolňováním¹⁰.

Léčiva 4. třídy BCS

Léčiva 4. třídy BCS mají nízkou rozpustnost a nízkou permeabilitu, která odráží nízkou biologickou dostupnost obdobně jako u léčiv 3. třídy. U disolučních zkoušek je vhodné použít umělou žaludeční nebo střevní šťavu bez enzymů. Přídavek tenzidu zde často umožní úplné rozpouštění léčiva¹⁰. U léčiv této kategorie ale není dovoleno vynechat zkoušku bioekvivalence.

V tab. III jsou uvedeny předpoklady IVIVC pro léčiva s prodlouženým uvolňováním. Jedná se o novou klasifikaci, ve které je 1. a 2. třída BCS dále členěna podle toho, zda je permeabilita léčiv závislá na místě uvolnění léčiva a zda se jedná o léčiva s úzkým terapeutickým indexem. Klasifikace neuvádí 3. a 4. třídu BCS, protože IVIVC lze pro tyto třídy stanovit obtížně nebo ji nelze stanovit vůbec. Přidává ale 5. třídu, do které řadí léčiva s proměnlivou rozpustností a permeabilitou. 5. třída se dále člení na podtřídu pro kyselá léčiva a podtřídu pro zásaditá léčiva².

Protože přímou korelaci křivky rozpouštění *in vitro* s křivkou plazmatické koncentrace *in vivo* nelze provést, používá se jednostupňového nebo dvoustupňového modelu odhadu časového průběhu plazmatické koncentrace.

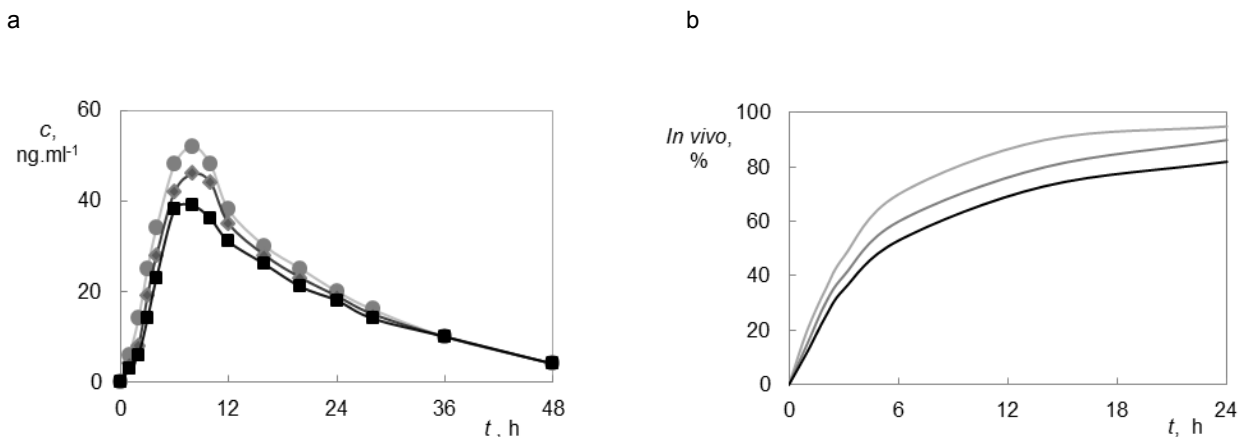
Výhodou jednostupňového modelu je, že vztah mezi množstvím léčiva uvolněným *in vitro* a plazmatickou koncentrací *in vivo* je určen přímo v jednom kroku. Z disolučních profilů uvolňování léčiva a vztahu *in vitro* – *in vivo* se zjistí profily plazmatické koncentrace pomocí konvoluce. Potom se porovnají s naměřenými profily plazmatické koncentrace *in vivo*¹.

U dvoustupňového modelu se využívají data o množství léčiva uvolněného *in vivo* získaná z pozorovaných křivek plazmatické koncentrace pomocí dekonvoluce. Model IVIVC založený na dekonvoluci zahrnuje výpočet profilu uvolňování *in vivo* z křivky plazmatické koncentrace

Tabulka III

Předpoklady IVIVC pro léčiva s prodlouženým uvolňováním na základě tříd BCS²

Třída	Rozpustnost	Permeabilita	Předpoklady IVIVC pro léčiva s prodlouženým uvolňováním
1a	vysoká, nezávislá na místě	vysoká, nezávislá na místě	lze stanovit IVIVC na úrovni A
1b	vysoká, nezávislá na místě	závislá na místě, léčiva s úzkým terapeutickým indexem	lze stanovit IVIVC na úrovni C
2a	nízká, nezávislá na místě	vysoká, nezávislá na místě	lze stanovit IVIVC na úrovni A
2b	nízká, nezávislá na místě	závislá na místě, léčiva s úzkým terapeutickým indexem	lze stanovit slabou IVIVC nebo ji nelze stanovit vůbec
5a kyselá léčiva	proměnlivá	proměnlivá	lze stanovit slabou IVIVC nebo ji nelze stanovit vůbec
5b zásaditá léčiva	proměnlivá	proměnlivá	lze stanovit IVIVC na úrovni A



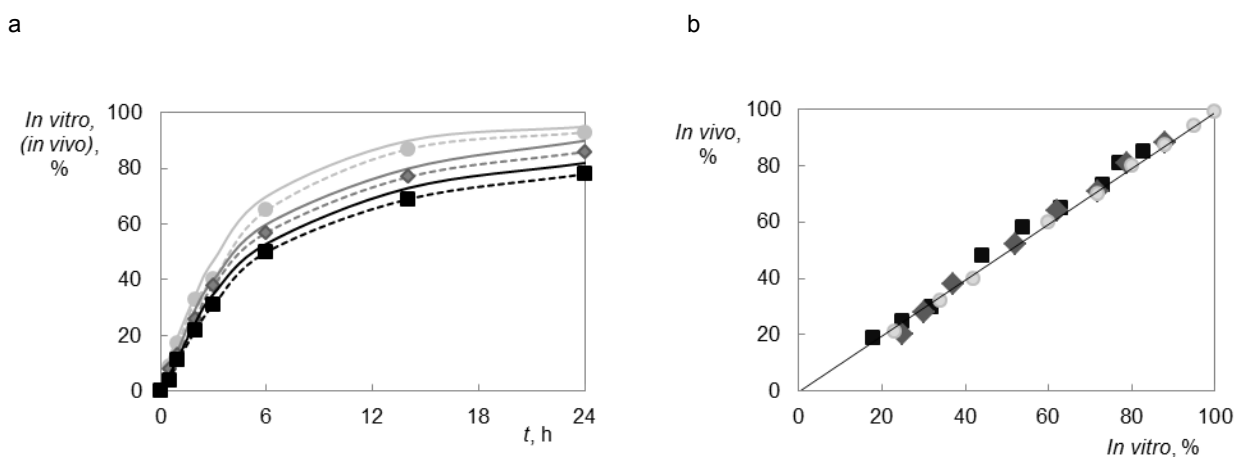
Obr. 1. Výpočet profilů uvolňování *in vivo* (b) z křivky plazmatické koncentrace *in vivo* (a), 3 léčivé přípravky, každý je vyznačen jiným odstínem

in vivo s použitím vhodné dekonvoluční metody (např. Wagner-Nelsonova metoda nebo Loo-Riegelmanova metoda) pro každý léčivý přípravek (obr. 1) a korelaci každého vypočítaného podílu uvolněné látky *in vivo* s podílem uvolněným *in vitro* (obr. 2). Při tvorbě IVIVC modelů se častěji používá dvoustupňového modelu⁸. Pro farmakokinetické výpočty slouží speciálně navržené softwary, například WinNonlin nebo Kinetika¹⁵. Korelace se hodnotí pomocí korelačního koeficientu, resp. koeficientem determinace, což je druhá mocnina korelačního koeficientu¹⁶.

Požadavkem pro určení IVIVC je stanovení disoluční křivky z průměru měření dvanácti jednotek (např. tablet a tobolek) v každém odběrovém bodě. Relativní směrodatná odchylka v každém bodě měření musí být menší než 10 %, pouze v prvním bodě může být variabilita větší, nesmí však přesahovat 20 %. Jen jeden, poslední odběrový

bod, může ležet v oblasti nad 85 % z celkového množství uvolněného léčiva, přičemž celkový počet odběrových bodů musí být minimálně 3. Data plazmatické koncentrace je nutno získat z homogenní skupiny alespoň 6 jedinců¹⁷.

IVIVC mají být validovány pomocí procentuální chyby odhadu. Aby mohla být IVIVC prediktivní a spolehlivá, měla by být chyba odhadu pro c_{\max} a AUC menší než 10 %. Základem pro posouzení vhodnosti korelace je i interní odhad chyby, nicméně přesnější je externí vyhodnocení⁴. Pokud změny při výrobě přípravků vedou ke změně rychlosti uvolňování, pak směrnice FDA použití IVIVC na základě interního odhadu chyby nedoporučuje. Toto doporučení bylo podpořeno studií zabývající se hydrofilními matricovými přípravky metoprolol-tartarátu. Studie vyhodnocovala schopnost IVIVC odhadnout vlastnosti přípravků léčiva s různými rychlostmi uvolňování *in vivo*.



Obr. 2. Porovnání křivek uvolňování *in vivo* a *in vitro* (a) a stanovení korelace regresní přímkou (b), 3 léčivé přípravky, každý vyznačen jiným odstínem, v grafu (a) jsou průběhy *in vivo* značeny plnou čarou, *in vitro* čárkovaně

IVIVC model odhadoval c_{\max} o 23 % vyšší, než byla pozorovaná hodnota. To dokazuje, že *in vitro* – *in vivo* korelace jsou vysoce specifické pro jednotlivé přípravky¹⁸.

4. Důležité faktory pro stanovení korelací *in vitro* – *in vivo*

Pro stanovení IVIVC je, mimo diskutovaných faktorů jako jsou zařazení léčivé látky do BCS, typ lékové formy a disoluční podmínky, potřebné zvážit i případný rozklad léčivé látky v důsledku enzymatických i neenzymatických reakcí, včetně vlivu metabolitů a rozkladných produktů a stereochemii léčivé látky.

Dříve, než se léčivo dostane do systémového oběhu, musí projít z gastrointestinálního traktu přes střevní stěnu a játra. Enzymy v játrech, střevním epitelu i střevní mikroflóre metabolizují některá léčiva, příp. vznikají samotné účinné metabolity. Snížení koncentrace léčiva pak může nastat vlivem nestability nebo tvorby komplexu se složkami gastrointestinálních tekutin, chymu nebo současně podaných léčiv. V případě, že má jeden enantiomer vyšší afinitu k receptorům, jako např. k transportním nosičům, než enantiomer opačný, dochází i k rozdílné farmakokinetice. Pokud jsou takovéto stereoisomery podávány perorálně ve formě směsi, může mít jedna léková forma vyšší biologickou dostupnost, případně i účinnost, než forma jiná. V takovém případě jsou disoluční data *in vitro* pro předpověď biologické dostupnosti aktivního enantiomeru obtížně použitelná¹⁹.

5. Vybrané studie zabývající se korelacemi *in vitro* – *in vivo*

V rámci IVIVC lékových forem obsahující léčiva zařazená do 1. třídy BCS se zkoušela korelace na úrovni A u tablet a tobolek s 12-hodinovým prodlouženým uvolňováním diltiazem-hydrochloridu, léčivé látky s anti-hypertenzním a antianginózním účinkem. IVIVC se prováděly za účelem posoudit technologii přípravy dané lékové formy z hlediska bioekvivalence s referenčním přípravkem. Disoluční zkoušky se prováděly v čistěné vodě, v 0,1 M HCl a ve fosforečnanovém tlumivém roztoku o pH 4,0 a 7,0 a při rychlosti otáčení pádel 50 ot/min. Podařilo se získat dobré korelační koeficienty pro referenční přípravek, pro testované tobolekky a pro testované tablety 0,990, 0,968 a 0,973. Dobrá korelace byla potvrzena úspěšnou *in vivo* bioekvivalentní studií hodnocených tablet i tobolek s referenčními tobolekami²⁰.

V jiné studii byla úspěšně provedena korelace na úrovni A u hydrofilních matricových tablet s 24-hodinovým prodlouženým uvolňováním antiepileptika valproátu sodného, která umožnila vyvinout nový přípravek a posloužila i k jistění kvality výroby. Disoluční zkouška se prováděla v přístroji s pádly, při 100 ot/min a 45 min v 0,1 M HCl a následně v 0,05 M fosforečnanovém tlumi-

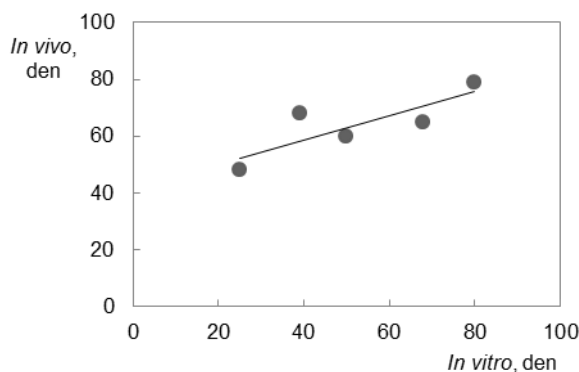
vém roztoku o pH 5,5, obsahujícího 75 mM laurylsulfátu sodného. Korelace byla validována s interní chybou odhadu pro c_{\max} a AUC menší než 9 % a s externí chybou odhadu menší než 8 % (cit.²¹).

Příkladem korelace na hladině B bylo injekční podání antipsychotika risperidonu ve formě mikročásteček. Risperidon patří do 2. třídy BCS, i když jeho permeabilita nehraje při injekčním podání podstatnou roli. Mikročástečky byly tvořeny z 60 % kopolymerem kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) a ze 40 % risperidonem. Částice se lišily poměrem obou kyselin (50:50, 65:35, 75:25 nebo 85:15). Disoluce se prováděla ve fosfátovém tlumivém roztoku o pH 7,4 (objem činil 200 ml pro poměr 50:50 a pro zbytek se použilo 2400 ml). Nádoby s implantáty se protřepávaly na třepačce při 40 kmitech/min. Vzorky se odebíraly v intervalech nejprve po 3 a 6 hodinách a poté po jednotlivých dnech až do počtu 112 dní. Mikročástečky se rovněž implantovaly krysám. Korelace na hladině B, při které se porovnávala střední disoluční rychlost a střední retenční čas léčiva, prokázala vysokou míru korelace $r^2 = 0,94$ (viz obr. 3, cit.²²).

V rámci IVIVC lékových forem obsahující léčiva zařazená do 2. třídy BCS se podařilo dosáhnout vysoké korelace na úrovni C i vysoké vícenásobné korelace na úrovni C (korelační koeficienty byly vyšší než 0,94) tablet s obsahem psychofarmaka aripiprazolu. IVIVC na úrovni C se zjišťovala pro množství léčiva rozpuštěného po 10, 20 a 30 min a hodnotu c_{\max} . Vícenásobná IVIVC na úrovni C se zjišťovala pro stejné disoluční parametry a hodnoty AUC_{0-1} , AUC_{0-2} , AUC_{0-3} hod. Disoluční zkouška probíhala v přístroji s pádlem, při 60 ot/min a v 0,1 M HCl (cit.²³).

V jiné studii se dosáhlo úspěšné korelace na úrovni A ($r^2 = 0,98$) u tablet s prodlouženým uvolňováním nevirapinu, antivirotika určeného k léčbě AIDS, při použití přístroje s košíčky, při 75 ot/min a ve fosforečnanovém tlumivém roztoku o pH 6,8 obsahujícího 2 % laurylsulfátu sodného²⁴.

Příkladem IVIVC lékových forem obsahující léčiva zařazená do 3. třídy BCS jsou tobolekky s prodlouženým



Obr. 3. Porovnávání souhrnného parametru (střední disoluční rychlosti) *in vitro* se souhrnným farmakokinetickým parametrem (střední retenční čas) *in vivo*

uvolňováním antidiabetika metformin-hydrochloridu. Stanovila se IVIVC na úrovni C mezi c_{\max} a střední dobou disoluce *in vitro* a mezi AUC a střední dobou disoluce *in vitro*. Korelace byla lineární s koeficienty determinace vyšší než 0,94, které ukazovaly na dobrou korelaci. Hodnoty chyby odhadu byly menší než 15 %. Korelaci na úrovni A pomocí dekonvoluce nebylo možné stanovit pravděpodobně z důvodu omezené absorpce metformin-hydrochloridu *in vivo*. Uvedená studie podpořila tvrzení, že stanovení IVIVC na úrovni A pomocí dekonvoluce je obtížně proveditelné pro léčiva s omezenou absorpcí¹⁴.

Příkladem IVIVC lékových forem obsahující léčiva zařazená do 4. třídy BCS jsou tobolky s okamžitým uvolňováním ritonaviru, antivirotika určeného k léčbě AIDS. IVIVC se zde využila pro nastavení podmínek disoluční zkoušky, která je u léčiv 4. třídy BCS problematická. Při použití přístroje s pádlem při 25 ot/min a čištěné vody s 0,7 % laurylsulfátu sodného jako disolučního média, se podařilo dosáhnout IVIVC na úrovni A s vysokým koeficientem determinace $r^2 = 0,99$ i přesto, že se jednalo o lékovou formu s léčivem řazeným do 4. třídy BCS (cit.²⁵).

6. Závěr

Ačkoli byla s úspěchem publikována řada případů léčiv, kde jejich disoluce dobře korelovala s absorpcí léčiva v těle, v mnoha případech korelace mezi disolucí a absorpcí léčiva selhala. Problém špatné korelace mezi biologickou dostupností a disolucí může být způsoben komplikovanou absorpcí léčiva nebo nevhodně navrženou disoluční metodou. Průkazná disoluční metoda pro IVIVC by měla co nejpodobněji simulovat děj, který skutečně probíhá *in vivo*. Uvolňování léčiva *in vivo* je totiž ovlivňováno aktuální iontovou silou, změnami pH v trávicím traktu, peristaltikou, trávicími enzymy, žlučí, přítomností surfaktantů a zejména mechanismy aktivní i pasivní absorpce. Všechny tyto faktory jsou obtížně reprodukovatelné v podmínkách *in vitro*. Pro dobrou předpověď chování léčiva *in vivo* za použití metod IVIVC je zcela zásadní nalezení vhodné disoluční metody.

Práce vznikla za podpory IGA VFU Brno č.78/2012/FaF.

Seznam použitých symbolů

$(X_a)_t$	množství léčivé látky absorbované za čas t (kg)
V	objem centrálního kompartmentu (m^3)
C_t	koncentrace léčivého přípravku v centrálním kompartmentu v čase t (kg m^{-3})
k_e	eliminace konstanta prvního řádu (s^{-1})
k_{12}, k_{21}	konstanty definující transport mezi kompartmenty (v případě prvního řádu s^{-1})
F_{inf}	poměr množství léčivé látky absorbované v čase $t = \infty$ a celkového množství podané léčivé látky (bezrozměrná veličina)

α	poměr zdánlivé permeační konstanty prvního řádu a disoluční konstanty prvního řádu (bezrozměrná veličina)
D	množství léčivé látky uvolněné za čas t (kg)

LITERATURA

- Sakore S., Chakraborty B.: J. Bioequiv. Availab. 2011, 1.
- Chowdhury A. K., Islam, S.: AJPS. 2011, 6.
- Polli J. E., Crison, J. R., Amidon G. L.: J. Pharm. Sci. 85, 7 (1996).
- Ghosh A., Choudhury G. K.: J. Pharm. Res. 2009, 2
- Cardot J. M., Beyssac E., Alric M.: Dissolution Technol. 2007, 14.
- Emami J.: J. Pharm. Pharm Sci. 2006, 9.
- U. S. Food and Drug Administration: Guidance for Industry – Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation, and Application of In Vitro/In vivo Correlations, HFD-210 (U. S. FDA – CDER 1997).
- Qiu Y., v knize: *Developing Solid Oral Dosage Forms Pharmaceutical Theory and Practice* (Qiu Y., Chen Y., Zhang G. G. Z., ed.), kap. 17. Elsevier, Burlington 2009.
- Mandal A. S., Chatterjee S., Kundu S., Biswas, N., Guha A., Paul, S., Kuotsu K.: Int. J. Pharm. 421, 1 (2011).
- Yasir M., Asif M., Kumar A., Aggarwal A.: Int. J. PharmTech. Res. 3, 2 (2010).
- Emami J.: DARU 18, 3 (2010).
- Okumu A., DiMaso M., Löbenberg R.: Pharm. Res. 25, 12 (2008).
- Amidon G. L., Lennernäs H., Shah V. P., Crison J. R.: Pharm. Res. 12, 3 (1995).
- Balan G., Timmins P., Greene D. S., Marathe P. H.: J. Pharm. Sci. 90, 8 (2001).
- Langenbucher F.: Eur. J. Pharm. Biopharm. 53, 1 (2002).
- Chrástka M.: *Metody pedagogického výzkumu*. Grada, Praha 2007.
- Rettig H., Mysicka J.: Dissolution Technol. 2008, 15.
- Mahayni H., Rekh G. S., Uppoor R. S., Marroum P., Hussain A. S., Augsburgen L. L., Eddington N. D.: J. Pharm. Sci. 89, 10 (2000).
- Tiwari G., Tiwari R., Pandey S., Pandey P., Rai A. K.: Pharma Chem. 2, 2 (2010).
- Rafiq M., Wahab A., Ur-Rehman N., Hussain A., Muhammad S.: Afr. J. Pharm. Pharmacol. 4, 9 (2010).
- Dutta S., Qiu Y., Samara E., Cao, G., Granneman R.: J. Pharm. Sci. 94, 9 (2005).
- Amann L. C., Gandal M. J., Lin R., Liang Y., Siegel J. S.: Pharm. Res. 27, 8 (2010).
- Abdelbary A. A., Elshafeey A. H., El-Nabarawi M., Ellassasy A., Li X., Jasti B.: Curr. Trends Biotechnol. Pharm. 5, 4 (2011).
- Macha S., Yong C., Darrington T., Davis M. S., Ma-

- cGregor T. R., Castles M., Krill, S. L.: *Biopharm. Drug Dispos.* 2009, 30.
25. Rossi R. C., Dias C. L., Donato E. M., Martins L. A., Bergold A. M., Fröhlich P. E.: *Int. J. Pharm.* 2007, 338.

D. Vetchý^a, M. Kopecká^b, M. Vetchá^c, and A. Franc^a (^aDepartment of Pharmaceutics, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, ^bPharmacy, Polyclinic, Svitavy, ^cPharmacy, Mendel Sq., Brno): ***In Vitro – In Vivo Models in Drug Development***

Many experiments were performed to obtain *in vitro* – *in vivo* correlations for different drugs and formulations. Most of the correlations involve orally administered medical forms and those with prolonged release of the drug.

Most of the informative and recommendable *in vitro* – *in vivo* correlations are those at level A. If the correlation is not possible, a multiple correlation at level C is performed, then those at levels C and B and finally the correlation at level D. The drug dissolution data correlate well with those of drug absorption in the case of establishing the correlation at level A. Although many correlations at levels B and C were weak, good correlations could be also obtained. For immediate release preparations, correlation at level A is recommended. Correlations at level C are appropriate providing especially for preparations with immediate release of the drug, where it is difficult to establish a correlation at level A. Multiple correlations at level C are acceptable and comparable with those at level A IVIVC, but are not suitable for products with immediate release of the drug.