



ACADEMIA DE FARMACIA DE LA COMUNITAT VALENCIANA

DRA. DÑA. MARIVAL BERMEJO SANZ

**BIOFARMACIA Y FARMACOCINÉTICA,
PIONERAS DE LAS FRONTERAS EN EL VIAJE
DE LA PÍLDORA DORADA AL SIGLO XXI**

Discurso de recepción como Académico correspondiente

Dra. Dña. Marival Bermejo Sanz

Leído en Valencia el día 7 de junio de 2019

Dra. Dña. Marival Bermejo Sanz

BIOFARMACIA Y FARMACOCINÉTICA,
PIONERAS DE LAS FRONTERAS
EN EL VIAJE DE LA PÍLDORA
DORADA AL SIGLO XXI

Tabla de contenido

1.Preámbulo	7
2.Las fronteras humanas y su estudio: Biofarmacia y Farmacocinética	11
A.El intestino, la última frontera	16
i.Conocer la barrera. Métodos experimentales	17
Permeabilidad, mecanismos	18
Excipientes: ¿inertes o no?	29
ii.El sistema de clasificación Biofarmacéutica	34
Fundamentos teóricos del BCS	34
Clases del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS) e implicaciones farmacéuticas.	36
Bioequivalencia in vitro e in silico	38
El intestino in vitro	42
iii.Observando en directo el intestino	45
Estudios de intubación en humanos	45
B. El cerebro, la fortaleza derrotada.	50
iv.Modelos in vitro	51
v.Caballos de Troya	54
3.Conocimiento sin fronteras: La biofarmacia como herramienta de desarrollo social.	57
4.Nuestras barreras futuras.	61
5.Conclusiones	63
6.Bibliografía relevante.	65

1.- Preámbulo

Excmo. Sr. Presidente de la Academia de Farmacia de la Comunitat Valenciana

Autoridades

Ilmos. Señores Académicos

Queridos compañeros y amigos

Señoras y Señores,

Soy Farmacéutica. Lo digo hoy con orgullo, aunque también con humildad en este Colegio como casa de los farmacéuticos, ya que gracias a la fortuna de formar parte de su junta de gobierno he podido apreciar, en toda su extensión, el significado de nuestra profesión y su impacto en la salud de la población, aunque a nivel personal haya pasado años dedicada a una parcela concreta del mundo farmacéutico como es la investigación.

Desde la perspectiva profesional entrar a formar parte como Miembro Correspondiente de la Academia de Farmacia de la Comunitat Valenciana implica reafirmar mi compromiso de promover la educación e investigación en ciencias farmacéuticas, en la que me preceden profesionales destacados, a los que admiro y cuyas expectativas confío en no defraudar. A nivel personal quisiera manifestar mi respeto y gratitud por esta distinción, empezando por la Dra Doña Fe Ballester Ferrer como valedora de mi candidatura y a los Doctores Don Jose Luis Moreno Frigols, Don Agustín Llopis González y Don Diego Cor-

tés Martínez por su aval a la misma. También quiero agradecer a todos aquellos que han marcado mi trayectoria profesional y por ello han hecho posible que hoy yo esté aquí. En primer lugar, al Profesor José M^a Plá Defina, mi director de tesis y mi padre científico, reconocido como uno de los introductores de la Farmacocinética y la Biofarmacia en el Curriculum Farmacéutico en España y a su discípulo el Prof. Vicente G. Casabó Alós, mi maestro y mi amigo, de quien lo aprendí todo sobre estadística y modelado farmacocinético. A nivel internacional han marcado mi carrera el Profesor Gordon Amidon, figura indiscutible en la Biofarmacia moderna, que ha sido un mentor y un ejemplo constante desde que visité por primera vez su laboratorio, allá por el año 99, y la Dra. Regina Pezoa que me involucró en la aventura de la difusión de las ciencias farmacéuticas en Latinoamérica y me avaló como Miembro Correspondiente Extranjero de la Academia de Ciencias Farmacéuticas de Chile. Regina es una de esas personas que mueven el mundo y causan impacto en su nación y cuyas contribuciones a la mejora de la salud, a la educación de los profesionales sanitarios y a las políticas del medicamento han sido incalculables.

Antes de iniciar el discurso y, haciendo un inciso personal, permítanme que también reconozca la contribución de mis seres queridos pues sin duda su apoyo ha sido determinante en mi vida. En primer lugar, a mis padres, Agustín, Dori y M^a Elena, por alentarme a elegir la ciencia y la enseñanza como vocación, a mis hermanos Agustín y Paloma con quienes aprendí a ser curiosa y descubrí la Farmacia como profesión, a mis hijos Marival, Blanca y Miguel por que sean cuales sean mis logros vitales ellos son la parte de mi Curriculum de la que me sentiré siempre más orgullosa y a mi esposo, Jose Luis porque él es mi hogar. Gracias a todos por su generosa renuncia a tenerme a su lado cuando mi trabajo lo ha requerido y su incansable aliento a no tener miedo a nada.

El tema que he elegido para el presente discurso versará sobre la Biofarmacia y la Farmacocinética, que yo defino como las ciencias de las fronteras o barreras biológicas, de ahí el adjetivo de pioneras, de aquellas que tenían que ir más allá de los límites conocidos. Quisiera describirles cómo estas disciplinas han guiado la evolución de la Farmacia desde la elaboración de las medievales píldoras doradas a medicamentos estables, seguros y eficaces, que podemos dirigir a sus dianas, personalizar para pacientes concretos e incluso controlar con nuestros dispositivos móviles. En realidad, lo que quiero contarles es mi aventura personal, no pude ser arqueóloga-mi sueño infantil- pero me lancé a la exploración de otras incógnitas y en ese camino además de los tesoros encontrados lo mejor han sido los compañeros de viaje, mi equipo de investigación y mis doctorandos a los que debo las ganas de seguir descifrando

jeroglíficos y sin los que no hubiera llegado aquí.

Mi discurso está dividido en tres partes, en la primera resumiré nuestras aportaciones a desarrollo de la vía oral y al conocimiento de la barrera intestinal y nuestros esfuerzos actuales para cruzar la barrera hematocencefálica, en la segunda explicaré como el desarrollo biofarmacéutico puede ser también una estrategia de desarrollo social y económico y en la tercera algunas aplicaciones prácticas y nuestros sueños futuros porque en nuestra ciencia aún quedan lenguajes no descifrados.

2.- Las fronteras humanas y su estudio: Biofarmacia y Farmacocinética

La ciencia que se ocupa de la preparación y uso de los medicamentos se ha denominado, tradicionalmente, Farmacia Galénica. Esta ciencia se ha desarrollado profunda y rápidamente en el siglo XX y, a consecuencia de los cambios que ello ha supuesto, se ha dividido en campos especializados del saber con entidad propia, entre ellos, la Tecnología Farmacéutica, la Biofarmacia y Farmacocinética, la Tecnología Industrial y la Farmacia Clínica.

A lo largo de la historia, la Galénica se ha transformado en el arte de preparar medicamentos según métodos empíricos y descriptivos en una aplicación práctica de conocimientos científicos, que extiende su objetivo desde la formulación hasta la consecución de la respuesta terapéutica óptima.

Este cambio se propició especialmente cuando la investigación de nuevos medicamentos recibió un notable impulso, a partir de los años 30 del pasado siglo y se demostró la existencia de una serie de factores que afectan a la actividad de la medicación administrada. Las diferencias, en ocasiones significativas, en la respuesta farmacológica y en la eficacia clínica de un fármaco incorporado en dosis semejantes a diferentes formas de dosificación e, incluso, a formas de dosificación similares, indujo a pensar en la existencia de una variabilidad dependiente de factores relacionados con la formulación y el proceso tecnológico de elaboración. Estos hechos, unidos a un mayor conocimiento sobre el papel fisiológico de las diferentes vías de administración en los procesos de absorción de los fármacos, contribuyeron al nacimiento de la ciencia que recibió la denominación de Biopharmaceutics. El término, que ha

sido traducido al castellano como Biofarmacia, fue acuñado en 1960 por Levy e introducido en la literatura científica por Wagner¹ en 1961. A partir de entonces, la evolución de esta disciplina ha sido espectacular.

Según Wagner², *la Biofarmacia es el estudio de la influencia de la formulación sobre la actividad terapéutica de un fármaco. En ella se tratan todos los posibles efectos de la forma de dosificación en la respuesta biológica y todos los posibles factores fisiológicos que pueden afectar al principio activo y a la forma farmacéutica que lo incluye.*

El principal impulso de la Biofarmacia se originó tras la definición de biodisponibilidad en los años 60. Este concepto implica el reconocimiento de que una forma farmacéutica técnicamente perfecta puede ser ineficaz por no alcanzar el adecuado aprovechamiento por parte del organismo.

La biodisponibilidad ha sido definida por la Organización Mundial de la Salud³ como *la cuantía y velocidad de disponibilidad de un principio activo en una forma farmacéutica, como se mide a partir de la curva de concentración-tiempo en la circulación sistémica o por su excreción en orina.*

Las variaciones en la biodisponibilidad, que en ocasiones pueden ser muy importantes, pueden estar relacionadas con la forma de dosificación o con el paciente. Los factores relacionados con la forma farmacéutica pueden y deben controlarse y engloban todos aquéllos que dependen de las propiedades físico-químicas del principio activo, de la formulación y del proceso tecnológico de elaboración.

Paralelamente surgió el concepto de bioequivalencia entre diversas formas de dosificación que pueden presentar diferencias muy significativas en el proceso de absorción, tanto en cantidad como en velocidad. El concepto de bioequivalencia deriva directamente del de biodisponibilidad: dos formulaciones son consideradas bioequivalentes, según la OMS, si son equivalentes farmacéuticos y sus biodisponibilidades (en magnitud y velocidad) tras la administración de la misma dosis molar son similares en tal medida que sus efectos son esencialmente los mismos.

Si se analizan los conceptos enunciados se perfilan tres factores fun-

1 Wagner, J.G. *Biopharmaceutics. Absorption aspects.* J. Pharm. Sci :50, 359-387 (1961).

2 Wagner J.G. *Drug Int Clin Pharm* 2: 31 (1968).

3 WHO expert committee on specifications for pharmaceutical preparations. WHO technical report series 863. *Thirty four report Geneva (1996).*

damentales, las propiedades físico-químicas, inherentes al fármaco, la forma de dosificación, dependiente de factores tecnológicos y el sustrato biológico, que no es otro que el paciente.

Si se considera que, para cada caso, permanecen prácticamente constantes el primero y el tercero, no resulta difícil concluir que la Biofarmacia, que se basa en principios y métodos de otras muchas disciplinas (como Físico-Química, Matemáticas, Química, Fisiología y Farmacología) puede considerarse como la parte de la Farmacia Galénica que estudia los problemas de ésta *in vivo*.

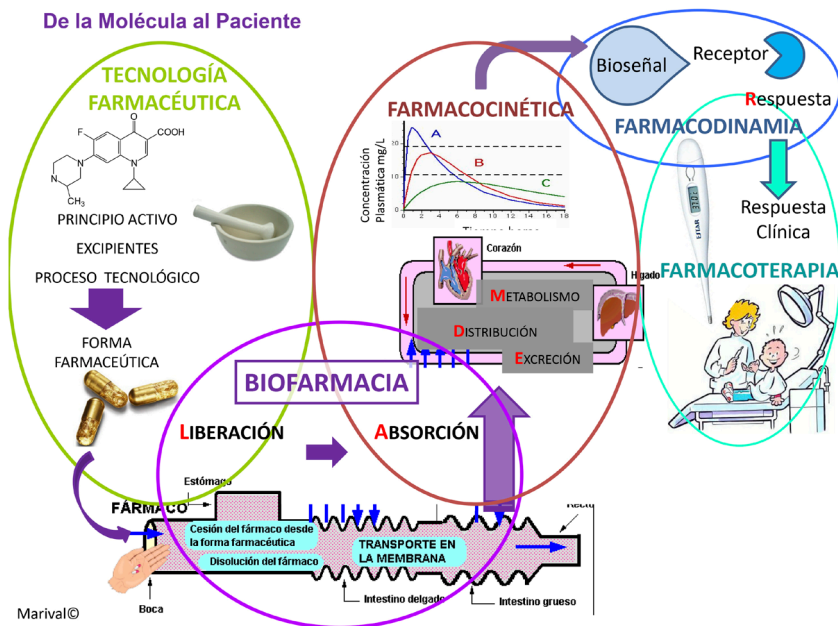


Figura 1. Esquema de las relaciones entre las distintas disciplinas que se agrupan bajo la denominación Farmacia Galénica: La Tecnología Farmacéutica, la Biofarmacia y la Farmacocinética se articulan alrededor de los procesos del LADME.

La Biofarmacia traspasó los límites de una simple disciplina descriptiva gracias al desarrollo de la Farmacocinética. El término "Farmacocinética" alude a la aplicación de los principios de la cinética al medicamento. Se considera a Teorell el fundador de esta disciplina pero el término fue acuñado por

Dost⁴ quien la definió como *la ciencia del análisis cuantitativo entre organismo y medicamento*. Según Wagner⁵ *el objetivo de la farmacocinética consiste en estudiar la evolución temporal de las concentraciones y cantidades de medicamentos y metabolitos en los fluidos biológicos, tejidos y emuntorios, así como su respuesta farmacológica y construir modelos adecuados para interpretar los datos obtenidos*.

El fármaco, tras su administración extravasal, debe liberarse de la forma de dosificación que lo contiene, absorberse para pasar al torrente circulatorio y desde allí, distribuirse en el organismo hasta alcanzar la biofase mientras se elimina por metabolismo y/o excreción. Todos estos procesos se conocen por las siglas LADME. Los cuatro últimos son el objeto de estudio de la Farmacocinética. Como se ilustra en la Figura 1, el proceso de absorción constituye el vínculo que liga la Biofarmacia y la Farmacocinética y el proceso de liberación constituye el nexo de unión entre la Tecnología Farmacéutica y la Biofarmacia.

La necesidad de analizar e interpretar los procesos cinéticos de los fármacos a partir de las concentraciones de éstos, en uno o varios fluidos biológicos, ha contribuido al desarrollo de modelos matemáticos con base fisiológica, esenciales para tratar de describir y cuantificar procesos dinámicos como absorción, distribución, biotransformación y excreción. A pesar de la complejidad inherente a la mayoría de ellos, pueden describirse, en muchos casos, mediante una cinética aparente de primer orden. Este hecho permite utilizar modelos farmacocinéticos muy sencillos en determinadas situaciones, como ocurre en Farmacocinética Clínica.

La realización del análisis farmacocinético utilizando modelos se basa en tres premisas fundamentales, claramente interdependientes: la selección de un modelo farmacocinético apropiado, el ajuste de los datos experimentales a las ecuaciones propias del modelo y la utilización de los parámetros farmacocinéticos optimizados. Permite conocer de antemano los niveles de fármaco en plasma, tejidos y orina para cualquier régimen de dosificación. Esta información, a su vez, es útil para determinar la influencia de factores fisiopatológicos sobre el comportamiento cinético de los principios activos y para modular la distribución e, incluso dirigir mediante diferentes estrategias tecnológicas, el principio activo al órgano en el que éste va a ejercer la acción farmacológica

4 Dost F.H. *Der Blutspiegel. Kinetik der Konzentration-sabläufe in der Kreislauflässigkeit*. Georg Thieme Verlag, Leipzig (1953)

5 Wagner J.G. *Pharmacokinetics. Ann. Rev Pharmacol.* 8, 67-94 (1968).

(vectorización). Finalmente, los parámetros cinéticos permiten evaluar la biodisponibilidad de los principios activos incorporados en diferentes formulaciones, lo que entronca directamente con los conocimientos de la Biofarmacia y también con la Tecnología Farmacéutica.

En este sentido, el desarrollo de la Biofarmacia ha impulsado un cambio cualitativo en la orientación tecnológica al introducir en ella los criterios fisiológicos de la vía de administración que permitan el aprovechamiento óptimo.

La Tecnología Farmacéutica, en un sentido amplio, se ocupa del *diseño, producción y evaluación* de las formas de dosificación de medicamentos. Se inicia, en su concepción actual, cuando la industria farmacéutica toma conciencia de que la producción de medicamentos a partir de las materias primas implica la aplicación coordinada y sucesiva de diversas operaciones básicas o unitarias. El conocimiento de estas operaciones, que no son otra cosa que procesos de transferencia de materia, calor o cantidad de movimiento, permite aplicar sus principios generales a cualquier método de fabricación concreto, de manera que se simplifica su estudio y perfeccionamiento.

Como ya se ha comentado, el correcto diseño de la forma farmacéutica tiene una influencia decisiva en su eficacia terapéutica; de esta manera, el problema tecnológico fundamental es cómo dirigir este proceso y la fabricación del medicamento. Cabría considerar cuatro fases secuenciales: la *preformulación*, de cuyas conclusiones obtendremos la *formulación* y su *procedimiento de fabricación*, seguidos del adecuado *acondicionamiento*, sin olvidar que todos estos procesos se han de desarrollar en un entorno que garantice la calidad global.

Mediante la preformulación se lleva a cabo un estudio completo, fundamentalmente físico-químico, de todos los elementos constitutivos de la formulación. Cabe señalar aquí que, el conocimiento del papel que pueden desempeñar los excipientes en la liberación del principio activo y, como consecuencia, en su actividad terapéutica, ha sido uno de los avances cruciales en el campo de la Tecnología Farmacéutica. Además de los factores fisicoquímicos, en esta fase del diseño deben considerarse todos los aspectos que dependen del organismo, es decir, las características de la vía de administración, y a su vez, cómo influye ésta en la liberación del fármaco. En última instancia, la preformulación es parte del diseño biofarmacéutico de las formas de dosificación. Su estudio puede llevarse a cabo en ambas disciplinas, lo que es un ejemplo de la profunda relación que la moderna Tecnología Farmacéutica tiene con la

Biofarmacia.

La Biofarmacia investiga, entre otros campos hoy en día, posibles alternativas a las vías de administración tradicionales y las formas farmacéuticas aptas para cada una de ellas. En el mismo sentido se están desarrollando métodos *in vitro* para el estudio de la absorción, puesto que un mejor conocimiento de las barreras biológicas permitirá racionalizar el diseño, tanto de las moléculas activas como de los sistemas de liberación. Con ello, finalmente, se podría reducir el coste y el tiempo necesario para la introducción en el mercado de nuevos agentes terapéuticos.

A.- El intestino, la última frontera

La vía oral es la más natural, fisiológica y en general preferida por los pacientes entre las alternativas posibles, para la administración de medicamentos. Es la utilizada con mayor frecuencia; en ausencia de problemas de deglución que a veces incluso son soslayados mediante sondaje nasogástrico.

A pesar de que nuestro conocimiento de la anatomía y fisiología del tracto digestivo se ha incrementado exponencialmente en las pasadas décadas aún quedan sin caracterizar de manera completa muchas variables fisiológicas que afectan al proceso de absorción oral como la distribución longitudinal de muchos transportadores intestinales, la evolución con el tiempo de los volúmenes de fluidos en los diferentes segmentos intestinales o los patrones de motilidad gástrica o intestinal.

Se pierde de vista con facilidad que el contenido de nuestro tracto gastrointestinal, técnicamente está “fuera” de nuestro sistema. Por ilustrarlo con un ejemplo familiar, nuestro lumen intestinal correspondería al agujero central del Roscón de Reyes. La barrera intestinal es la frontera que separa el exterior del interior y aún contiene tantas incógnitas como el espacio exterior.

En el desarrollo inicial de formas farmacéuticas para la vía oral uno de los objetivos principales era el enmascaramiento del sabor para facilitar la deglución por parte del paciente, de ahí el origen de “dorar” las píldoras bien con azúcar o incluso con pan de oro. Como sabemos hoy en día para conseguir

un medicamento oral eficaz hace falta mucho más que encontrar el principio activo y ponerlo en una pastilla. Menos del 12% de moléculas activas acaban convertidas en medicamentos y en un porcentaje aún elevado de casos el problema se debe a la imposibilidad de que las moléculas crucen la barrera fisiológica de la vía de administración

Nuestra contribución al estudio de la vía oral de administración se ha centrado alrededor de la validación de métodos experimentales, *in vitro* (en modelos celulares o dispositivos de disolución), *in situ* (en rata anestesiada) o *in vivo* (en rata) para predecir la absorción en humanos. Recientemente hemos iniciado la exploración de la barrera hematoencefálica mediante la propuesta de nuevos modelos *in vitro* para predecir el acceso al sistema nervioso central.

I.- Conocer la barrera. Métodos experimentales

En la actualidad existe un amplio abanico de métodos experimentales y computacionales para predecir la absorción en intestino humano. Los métodos más sencillos *in vitro* son los cultivos celulares que presentan la ventaja de su potencial robotización y por ende la alta capacidad de cribado de moléculas. Más cercanos a la realidad fisiológica se encuentran los modelos animales bien *in situ*, es decir mediante la observación directa del tejido de interés en general con el animal anestesiado, o *in vivo* es decir con el animal consciente. Los modelos *in vivo* producen los mejores resultados, por incluir todas las variables fisiológicas, pero obviamente, su capacidad de cribado es baja y no adecuada para el elevado número de compuestos a evaluar en la etapa de descubrimiento. Por otro lado, los modelos *in vitro* ofrecen buenos resultados a la hora de predecir la permeabilidad por difusión pasiva, pero se pierde información cuando existe un transportador de membrana implicado. Por ello cada modelo o método es adecuado para contestar un tipo de pregunta y su adecuada selección es importante, siendo conveniente en la mayor parte de casos, combinar la información proveniente de distintos modelos experimentales.

Por último, el desarrollo de modelos computacionales se basa en la recopilación previa de datos experimentales de los anteriores modelos y la construcción a partir de ellos de algoritmos matemáticos con capacidad predictiva, que a su vez se va mejorando con la continua incorporación de más datos experimentales.

Se describen en la siguiente sección alguno de los métodos de predic-

ción de la absorción mencionados y sus aplicaciones prácticas por ejemplo al estudio de la influencia de excipientes farmacéuticos en la absorción.

Permeabilidad, mecanismos

Un importante número de moléculas atraviesan la membrana intestinal por difusión pasiva y dado que la barrera tiene naturaleza lipídica, la lipofilia es una de las características fisicoquímicas fundamentales que determinan la permeabilidad intestinal. En este sentido nuestro grupo de investigación trabajó durante largo tiempo en estudiar las relaciones matemáticas entre la permeabilidad y el coeficiente de reparto de las moléculas.

1.- Modelos Biofísicos *in situ* en *in vitro*.

La técnica que se ha utilizado en nuestro laboratorio para caracterizar la absorción de los fármacos o candidatos es la descrita por el Profesor Doluisio y colaboradores con ligeras modificaciones. Consiste esencialmente en crear un compartimento estanco en el segmento intestinal de interés con el animal bajo anestesia, en el que se introduce la solución del fármaco y del que se toman muestras a tiempos establecidos con ayuda de las llaves de tres pasos y las jeringas. Ello permite observar la desaparición del compuesto de la luz intestinal debido al proceso de absorción.

Mediante esta técnica se obtuvieron las constantes de velocidad de absorción en intestino delgado completo de rata de numerosas familias de compuestos de carácter ácido, básico y neutro que se correlacionaron con parámetros representativos de su lipofilia como se observa en la Figura 2. Las correlaciones eran de tipo bihiperbólico para la mayoría de familias cuando el peso molecular era inferior a 250 daltons e hiperbólicas cuando el peso molecular era superior a ese valor.

Por otro lado, en colon las correlaciones eran siempre de carácter hiperbólico con independencia del peso molecular. Las conclusiones de todos estos estudios cristalizaron en el modelo biofísico de Pla delfina y Moreno que se resumen de este modo: La absorción intestinal mediante difusión pasiva es el resultado de dos procesos simultáneos, la difusión a través de la membrana intestinal y la difusión a través de los poros acuosos. La correlación entre los

Intestino Delgado

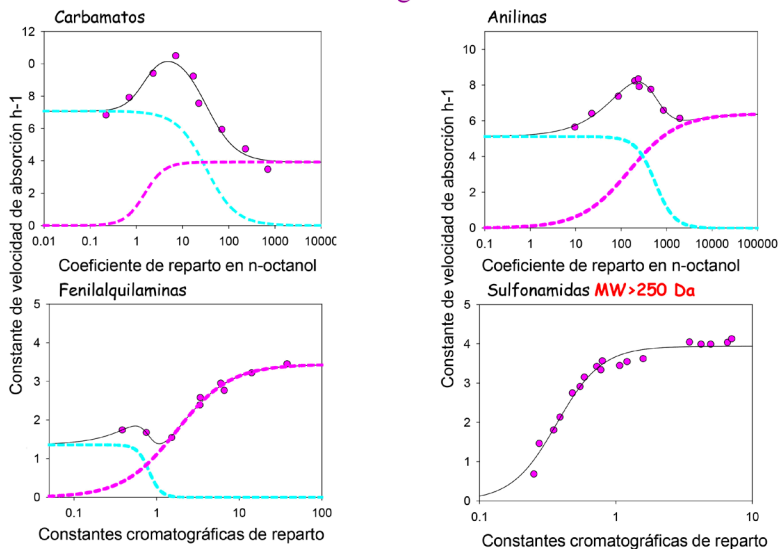


Figura 2. Correlaciones absorción-lipofilia obtenidas mediante la técnica de Dohuisio en intestino delgado de rata para diferentes familias homólogas de compuestos

valores de constantes de absorción y lipofilia puede representarse como la suma de dos ecuaciones hiperbólicas correspondientes a estos procesos. Una hipérbola directa para describir la difusión transmembrana y una inversa para describir el camino acuoso. Ambas hipérbolas presentan dos valores asintóticos K_m y K_p correspondientes a las constantes de absorción máximas a través de las vías transcelular y paracelular para los elementos más lipófilos y más hidrófilos respectivamente.

Como paso final de este proyecto se deseaba contrastar las conclusiones anteriores utilizando una familia de compuestos de carácter zwitteriónico. Se seleccionaron dos familias de fluoroquinolonas derivadas del norfloxacino y ciprofloxacino con peso molecular superior a los 350 daltons. La compañía de productos veterinarios Genavisa sintetizó ambas familias por adición de una cadena lateral de longitud creciente en el anillo lateral piperacínico.

Las correlaciones obtenidas en intestino delgado fueron de tipo monohiperbólico por ser todos los elementos de peso molecular mayor a los 250 daltons, con un valor asintótico debido a la resistencia de la capa acuosa de difusión. En la Figura 3 se observa la correlación para las dos familias de derivados quinolónicos.

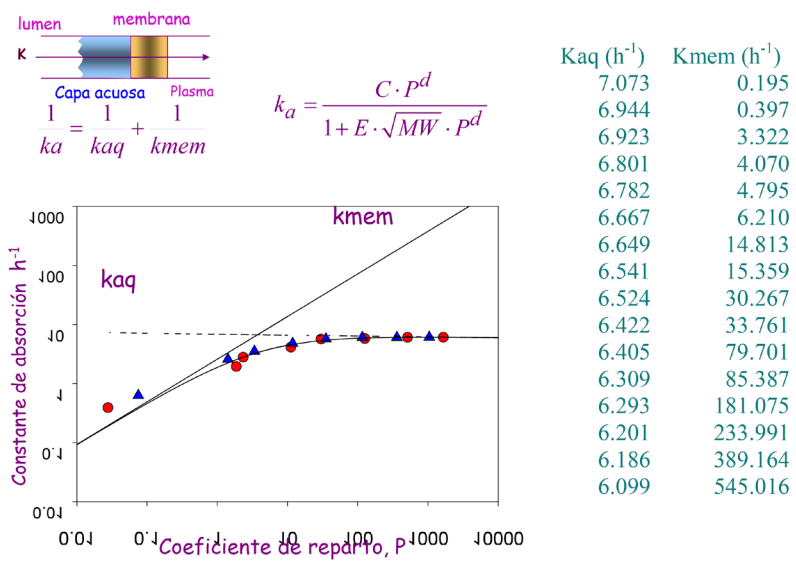


Figura 3. Correlación absorción lipofílica obtenida en intestino delgado para dos familias de derivados homólogos de norfloxacino y ciprofloxacino. Las líneas representan la relación entre difusión por membrana y difusión acuosa con la lipofilia y el peso molecular respectivamente.

Las conclusiones principales de este proyecto fueron que la lipofilia y el peso molecular son factores determinantes de la permeabilidad intestinal de los xenobióticos y que la capa acuosa de difusión puede actuar como factor limitante de la absorción a través de la membrana intestinal. Por otra parte, se desarrollaron modelos matemáticos que permitían predecir el valor de permeabilidad a partir de parámetros fisicoquímicos de determinación sencilla.

2.- Modelado y predicción de la absorción oral.

De lo expuesto en la sección anterior se deduce que para moléculas que se absorben por difusión pasiva es relativamente sencillo tener buenas estimaciones de su potencial de absorción a partir de parámetros fisicoquímicos sencillos como la lipofilia o el peso molecular, sin embargo, cuando hay un proceso de transporte activo implicado la traslación del resultado en el modelo experimental a la especie humana se complica. No obstante, el modelado matemático puede resultar una herramienta excelente para extraer los parámetros

del transportador activo en cada modelo y escalar su contribución en sistemas más complejo. Esta aproximación se ilustra a continuación con el estudio que realizamos sobre una fluoroquinolona que resultó ser sustrato de la glicoproteína P, un transportador de secreción localizado en la membrana apical de los enterocitos y que, debido a ello, su permeabilidad no correspondía a la esperable en función de su lipofilia. Es decir, nuestras predicciones en base al modelo biofísico fallaban.

Con objeto de elucidar completamente el mecanismo de absorción del derivado CNV97100 y establecer un método de cálculo de los parámetros cinéticos de su absorción extrapolable a otros fármacos se realizaron experimentos con esta quinolona en diferentes segmentos intestinales: duodeno, yeyuno, íleon y colon además de en intestino completo. Se observó que a pesar de ser constante el pH de las soluciones de perfusión, el derivado CNV97100 presentaba una permeabilidad sitio-dependiente. Ello hacía sospechar de la participación en su absorción de la glicoproteína P puesto que su nivel de expresión es mayor en los segmentos distales que era donde la permeabilidad de la quinolona era inferior.

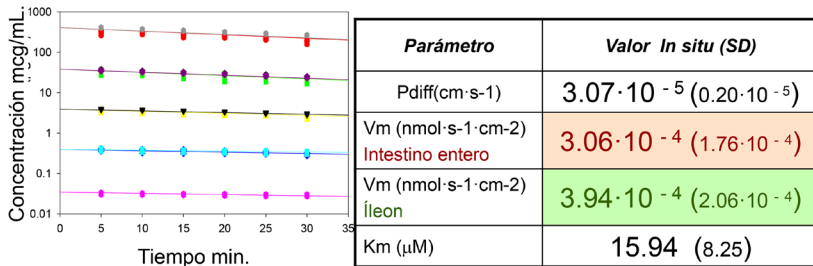
Al realizar experimentos a distintas concentraciones iniciales tanto en íleon como en intestino completo se observó que la permeabilidad de la quinolona se incrementaba al incrementar su concentración inicial de forma consistente con la saturación del transportador de secreción. Al incluir verapamilo en las soluciones de perfusión como inhibidor clásico de la P-gp se observó que todos los valores de permeabilidad se incrementaban a cualquier concentración inicial hasta un valor máximo que corresponde aproximadamente con el valor de la permeabilidad difusional de la quinolona.

Para caracterizar los parámetros del transportador y difusionales en ambos segmentos estudiados (íleon e intestino completo) se diseñaron diversos modelos de complejidad creciente y se procedió al ajuste de todos ellos a los datos experimentales para seleccionar el mejor desde el punto de vista estadístico. El modelo finalmente seleccionado responde a los siguientes supuestos:

- 1) el componente difusional de la quinolona es el mismo a lo largo de todo el intestino ya que se mantuvo constante y al mismo valor el pH de las soluciones de perfusión,
- 2) existe un transportador de secreción situado en la cara apical de los enterocitos.

- 3) la afinidad del transportador se mantiene constante a lo largo de todo el intestino
- 4) la velocidad máxima depende del nivel de expresión y es por ello más elevada en íleon.

Desde un punto de vista matemático estos supuestos se expresan a través de un conjunto de ecuaciones diferenciales que se muestran en la Figura 4 que incluyen el componente difusional y la secreción activa con valores de V_{max} diferentes para reflejar el superior nivel de expresión en íleon y las diferencias en el radio intestinal efectivo. Se confirmó que la V_{max} es superior en íleon, es decir se demostró desde un punto de vista funcional y cinético lo que otros autores habían demostrado utilizando en rata técnicas de medida de expresión proteica como el western-blot.



Intestine completo

$$\frac{dC}{dt} = -\left(\frac{2}{R_a} \cdot P_{diff}\right) \cdot C + \frac{2}{R_a} \cdot \frac{V_{max-a} \cdot C}{K_m + C}$$

Íleon

$$\frac{dC}{dt} = -\left(\frac{2}{R_b} \cdot P_{diff}\right) \cdot C + \frac{2}{R_b} \cdot \frac{V_{max-b} \cdot C}{K_m + C}$$

Figura 4. Ecuaciones diferenciales representativas del proceso de absorción de CNV97100 en intestino completo y en íleon de rata. Las velocidades máximas en ambos segmentos son diferentes. En la gráfica se observa la desaparición de la quinolona del lumen intestinal a las diferentes concentraciones iniciales.

En la siguiente fase del proyecto se decidió realizar experimentos con el mismo grupo de fluoroquinolonas en un nuevo sistema experimental: las monocapas celulares de Caco-2. Estas células derivadas de un carcinoma de colon humano crecen y se diferencian como enterocitos intestinales formando capas de una célula con microvilli e uniones intercelulares funcionales. De esta manera es posible cultivarlas sobre soportes porosos para obtener un modelo de barrera intestinal y observar el paso del compuesto de la cara apical a la basolateral o al contrario tal como se muestra en la Figura 5.

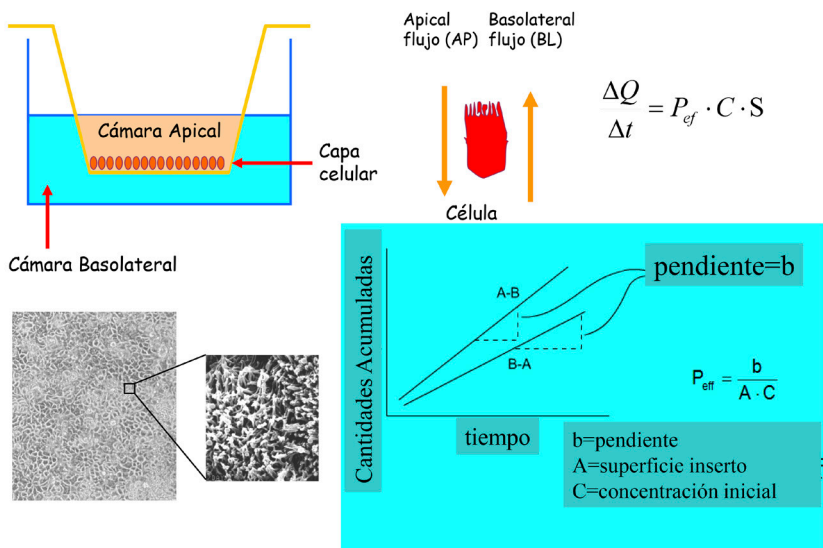


Figura 5. Esquema del cultivo de monocapas Caco-2 para estudio de permeabilidad intestinal. Se observa una fotografía de la monocapa con los microvilli y se ilustra el método de cálculo a partir de las cantidades acumuladas en el compartimento receptor

En el caso de la quinolona CNV97100 se obtuvieron permeabilidades apicales basales en este sistema que se incrementaban al aumentar la concentración por saturación del transportador de secreción y de manera homóloga a los resultados observados *in situ* en rata, mientras que las permeabilidades basales apicales disminuían al aumentar la concentración. El verapamilo también es capaz de ejercer una inhibición competitiva concentración dependiente hasta que la quinolona alcanza su valor de permeabilidad difusional pasiva en

ambas direcciones como se observa en la Figura 6.

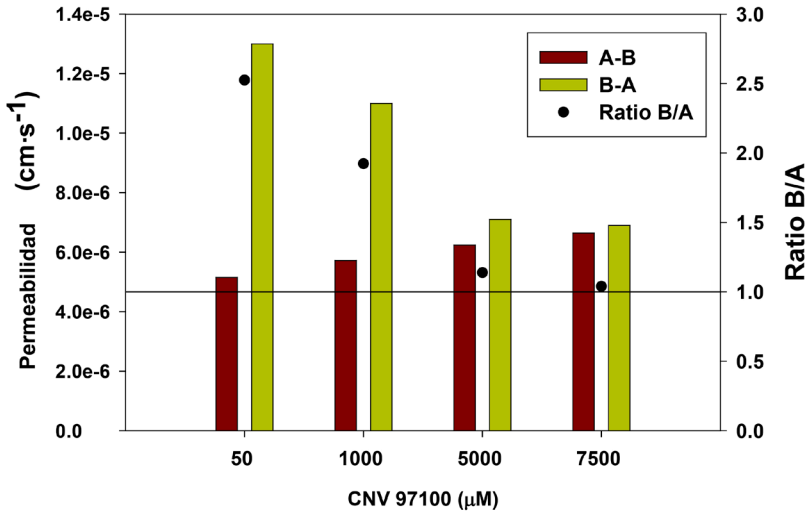


Figura 6. Valores del permeabilidad apical-basal (A-B) y basal-apical (B-A) de la quinolona CNV97100 en cultivos de monocapas Caco-2 a diferentes concentraciones iniciales mostrando en ambas direcciones la saturación del transportador de secreción.

Por ajustado de los diferentes modelos cinéticos a los datos y selección del mejor desde el punto de vista estadístico se concluyó que la quinolona era sustrato de un transportador de secreción localizado en la cara apical con lugar de unión intracelular que corresponde a la hipótesis aceptada para la glicoproteína P. También se pudo establecer que la membrana apical constituye la principal resistencia al transporte y de nuevo que el nivel de expresión de la glicoproteína determina una velocidad máxima superior en las líneas celulares con mayor nivel de expresión de este transportador.

Cuando se comparan los resultados experimentales obtenidos en rata y en monocapas celulares se observa que para todos los fármacos estudiados los valores de permeabilidad son siempre superiores en la rata. Las diferencias se deben a que en el animal están presentes los pliegues intestinales, los villi y los microvilli mientras que las monocapas solo poseen los microvilli de las células.

las intestinales por lo que la superficie de transporte en ambos sistemas difiere. Por otra parte, la restricción de la vía paracelular debido a las uniones estrechas también puede ser diferente en el animal versus la línea celular además de las posibles diferencias entre niveles de expresión de los transportadores intestinales. Es decir, para correlacionar los parámetros de un sistema con otro se han de tener en cuenta esos tres parámetros. No obstante, como se mostrará en la siguiente sección se ha podido obtener una excelente correlación entre los datos de permeabilidad de las quinolonas obtenidos en rata y en monocapas caco-2 ya que para estas quinolonas la vía paracelular está restringida con lo que su corrección no es relevante y para la mayoría el mecanismo de absorción es la difusión pasiva de forma que sólo debe tenerse en cuenta la diferencia en área efectiva de transporte.

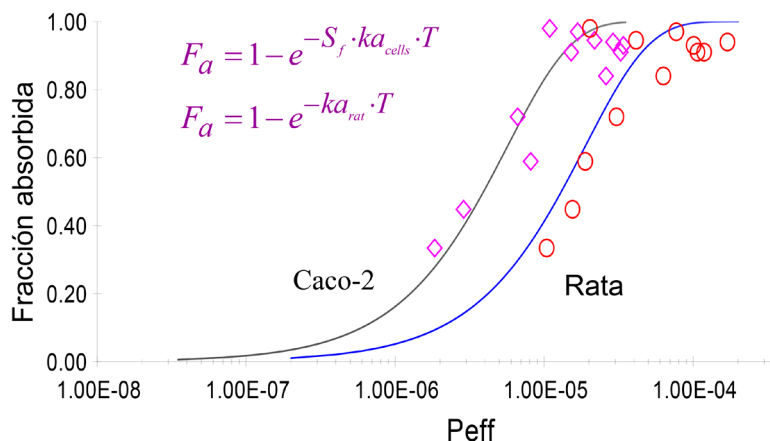
En resumen, esta aproximación matemática a ambos modelos experimentales permitió concluir que los resultados obtenidos *in vitro* son coherentes con los obtenidos *in situ*, que la membrana apical del enterocito es la principal resistencia al transporte y que el modelado matemático es una herramienta valiosa para establecer hipótesis sobre el mecanismo de absorción, la localización del transportador y de la resistencia a la difusión y que además permite el escalado de los datos entre diferentes modelos experimentales.

Como fase final de esta parte del proyecto era necesario demostrar que tanto los valores de permeabilidad intestinal *in situ* en rata como los valores de permeabilidad en monocapas Caco-2 eran capaces de predecir la fracción oral absorbida. Para ello dado que estas quinolonas no presentan efecto de primer paso intestinal o hepático se determinó su biodisponibilidad oral absoluta como medida de la fracción oral absorbida.

Para ello se administraron las diferentes quinolonas por vía oral e intravenosa utilizando una técnica de canulación permanente de la vena yugular en rata de forma que una vez implantada la cánula se puede administrar la solución de fármaco y tomar muestras de plasma para obtener las curvas de concentraciones plasmáticas frente al tiempo. A partir de las áreas bajo la curva (AUC) intravenosas y orales se determinó la Biodisponibilidad oral absoluta de cada quinolona.

En la Figura 7 se muestra la correlación entre valores de permeabilidad de la familia de quinolonas en rata y monocapas Caco-2 con la fracción oral absorbida. Se observa las diferencias de magnitud de los valores de permeabilidad en ambos sistemas y la estimación de la diferencia en área efectiva

de transporte (SF) obtenida por ajuste simultáneo de todos los datos experimentales.



Parámetro	Unidades	Valores	StdError	CV%
T	hours	1.314	0.175	13.32
SF	-	5.587	1.118	20.02

Figura 7. Correlación entre valores de permeabilidad de la familia de quinolonas en rata y monocapas Caco-2 con la fracción oral absorbida. Se observa las diferencias de magnitud de los valores de permeabilidad en ambos sistemas y la estimación de la diferencia en área efectiva de transporte (SF) obtenida por ajuste simultáneo de todos los datos experimentales.

De estos resultados se pudo concluir que la permeabilidad intestinal *in situ* obtenida en rata y la permeabilidad *in vitro* en Caco-2 son buenos predictores de la fracción oral absorbida *in vivo* para fármacos cuyo mecanismo de absorción es la difusión pasiva y que no están limitados por la dosis o la disolución.

Recientemente y gracias a la disponibilidad de valores de fracción oral absorbida desde el colon ha sido posible validar en modelo experimental de perfusión de un solo paso en rata para predecir la absorción en este segmento intestinal, aspecto de gran importancia en la actualidad debido al auge del desarrollo de formulaciones de liberación modificada cuyo lugar de absorción principal será este segmento intestinal. La Figura 8 muestra las correlaciones absorción en colon de rata versus absorción humana en colon y la comparación con otros modelos experimentales como la perfusión en intestino o en Caco-2.

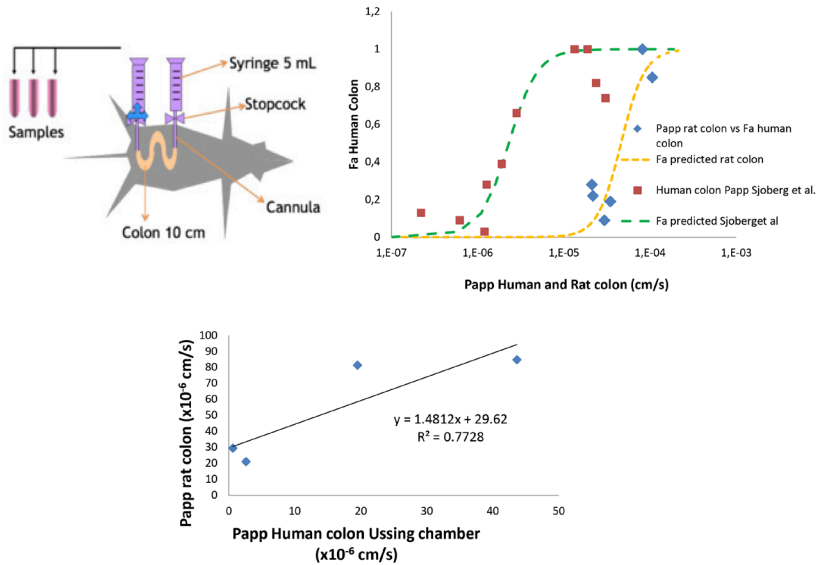


Figura 8. Correlación permeabilidad en colon de rata versus fracción absorbida en colon humano en la parte superior. En la inferior comparación y correlación con otros modelos experimentales.

En resumen, el método experimental seleccionado para caracterizar la permeabilidad depende de la fase del desarrollo, de la necesidad de capacidad de cribado y de la pregunta concreta que se desee responder, por ejemplo, averiguar si la absorbabilidad será suficiente o no o determinar el mecanismo de absorción e identificar el transportador. Un adecuado modelado y tratamiento matemático de los datos permite maximizar la información obtenida y mejorar la extrapolación de los resultados a sistemas de mayor complejidad.

3.- Desarrollo de estrategias de mejora de la absorción

Una vez conocidas las características fisicoquímicas y el mecanismo de absorción de una molécula se puede determinar cuáles son los factores limitantes para su absorción intestinal y en consecuencia diseñar estrategias que permitan mejorar tanto la velocidad como la magnitud de absorción.

Por ejemplo, la Amifostina cuya naturaleza ionizable básica e hidrofílica condiciona una escasa permeabilidad intestinal puede combinarse con otra sustancia de naturaleza ácida para formar un par iónico que de permanecer estable en los fluidos intestinales incrementa la lipofilia global del conjunto y por tanto su permeabilidad a través de la membrana intestinal. En efecto, fue posible mediante su combinación con ácido succínico conseguir un par iónico cuya biodisponibilidad oral en rata duplicaba la del fármaco aislado como se observa en la Figura 9.

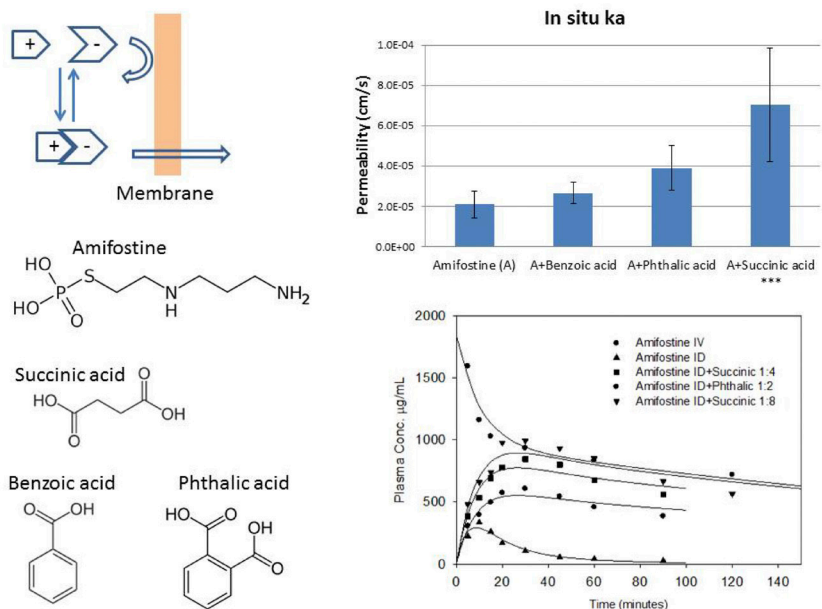


Figura 9. Formación de un par iónico Amifostina-Acido succínico como estrategia de incrementar su permeabilidad intestinal (figura superior derecha) y su biodisponibilidad oral (figura inferior derecha) en rata wistar.

En el caso de la Beta-Lapachona el problema de la molécula no es tanto su permeabilidad, que es moderada-alta, sino su solubilidad acuosa que limita su velocidad de disolución *in vivo*. En este caso la formación de un complejo con ciclodextrinas mostró dos propiedades favorables, por un lado la mejora en la velocidad de disolución acompañada de un incremento en la permeabilidad gracias a la apertura de la vía paracelular, aspecto que se observó tanto en el modelo celular *in vitro* como *in situ* en rata según se observa en la Figura 10

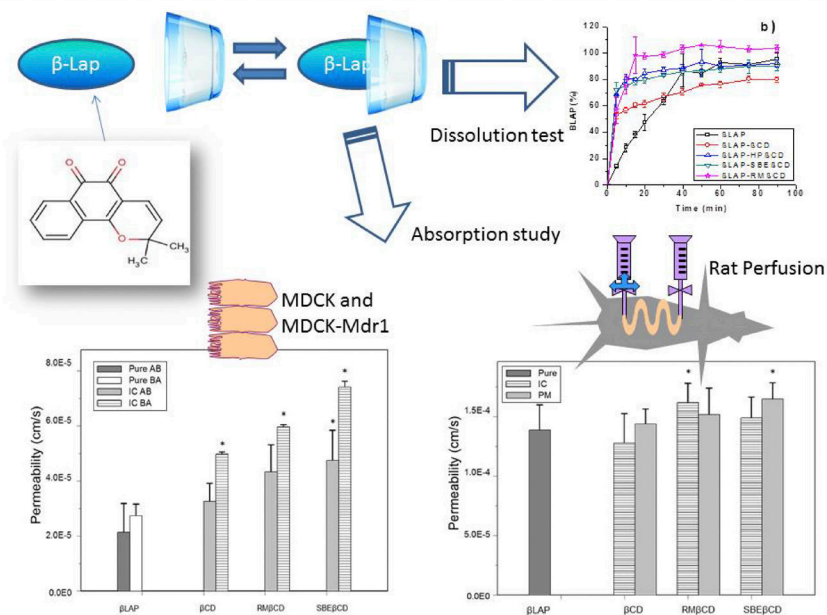


Figura 10. Formación de complejos de Beta-Lapachona con ciclodextrinas a fin de incrementar su velocidad de disolución y su permeabilidad intestinal

Excipientes: ¿inertes o no?

Influencia de los tensioactivos en la permeabilidad intestinal

Los tensioactivos se incluyen como excipientes en muchas formulaciones de fármacos con el objetivo de mejorar la constante de disolución y aumentar la

solubilidad del fármaco. Estos objetivos se basan en su capacidad de reducir la tensión superficial y el ángulo de contacto entre las partículas sólidas y el medio acuoso, mejorando así la capacidad de humectación del fármaco y aumentando la superficie disponible para la disolución del fármaco. Su influencia en la solubilidad total de los fármacos se relaciona con la inclusión de componentes poco solubles en el núcleo apolar de las micelas.

Por otra parte, estos aditivos farmacéuticos actúan como potenciales moduladores de la absorción. Sus efectos sobre la membrana intestinal, (es decir, sobre la permeabilidad del fármaco) son complejos y no están tan bien definidos. Muchos tensioactivos interactúan con las membranas de absorción potenciando la permeabilidad, este efecto se hace particularmente aparente cuando la concentración de tensioactivo en la solución de fármaco es igual o menor que la concentración micelar crítica (CMC). Sin embargo, si la concentración del mismo es mayor que su CMC, este efecto puede disminuir o incluso revertirse.

Para explorar los efectos de los tensioactivos sobre el tracto gastrointestinal, se realizaron ensayos de absorción (con familias de compuestos homólogos, o estructuralmente relacionados) en ausencia y en presencia de tensioactivos y con el fármaco a estudiar en disolución. Los tensioactivos se utilizaron a dos concentraciones diferentes: una concentración menor que la CMC y otra superior a la CMC (concentración supramicelar, CSM). Este diseño experimental permitió diferenciar la influencia de los monómeros de tensioactivo del efecto de las micelas. El siguiente paso fue establecer correlaciones absorción-lipofilia en ausencia y en presencia del aditivo, para determinar los cambios ejercidos por éste. Los ensayos se realizaron en estómago, intestino delgado y colon. Para establecer una hipótesis general adecuada para diferentes fármacos y tensioactivos, las investigaciones se realizaron incluyendo tensioactivos aniónicos, catiónicos y neutros, así como fármacos de carácter ácido, alcalino, neutro o anfótero. Como podrá observarse a continuación, el resultado global sobre la constante de absorción de cada compuesto depende de su propia lipofilia y del tensioactivo.

En los ensayos con tensioactivos sintéticos a CMC, el mejor modelo para describir la relación entre la constante de absorción y la lipofilia corresponde a una relación exponencial. La Figura 8 muestra los resultados obtenidos en colon de rata con lauril sulfato sódico y una serie de ácidos fenil-alquil-carboxílicos. Se observa que las correlaciones entre k_a y P en ausencia de tensioactivos son hiperbólicas, sin embargo, las correlaciones en presencia de CMC de ten-

siactivos sintéticos son siempre exponenciales, si bien con una pendiente bastante pequeña. Si la concentración de tensiactivo es menor o igual que la CMC el efecto limitante sobre los valores de k_a ejercido por la capa acuosa estática desaparece, lo que implica que no se observa una km. Además, tiene lugar un segundo efecto que consiste en un aumento de la polaridad de la membrana por el tensiactivo. Como se puede observar en la Figura 11, el cambio en la pendiente desde la ecuación hiperbólica a la exponencial puede conducir a un aumento de la constante de absorción, pero también a una disminución en este parámetro.

Tensiactivos sintéticos: Laurilsulfato sódico. Absorción en colon

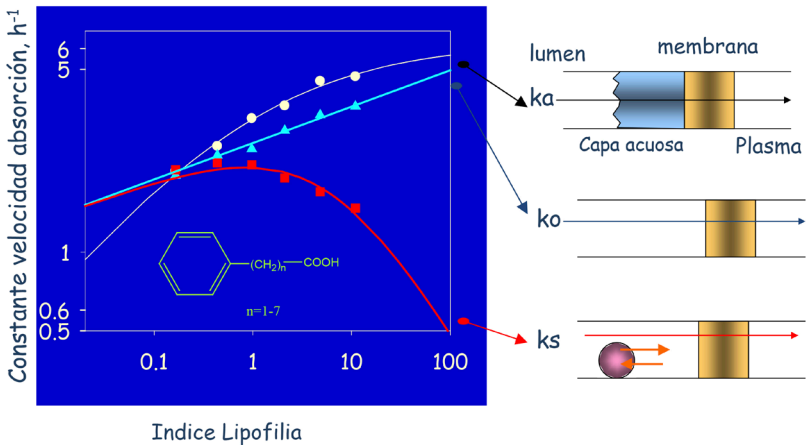


Figura 11. Correlaciones absorción lipofilia obtenidas en colon de rata wistar con una familia de ácidos fenilalquilcarboxílicos en ausencia y presencia de laurilsulfato sódico a dos concentraciones por debajo y por encima de la CMC.

Los tensiactivos naturales como el taurocolato sódico y el glicocolato sódico no son capaces de eliminar el carácter limitante de la capa acuosa de difusión adyacente a la membrana por el lado luminal. Por esta razón, en la administración de fármacos en presencia de estos tensiactivos naturales a concentraciones iguales a sus CMC, las correlaciones absorción-lipofilia siguen siendo hiperbólicas, como las obtenidas sin aditivos. En la Figura 12 se observan las diferencias entre las correlaciones obtenidas en presencia de polisorbato 80 y taurocolato sódico.

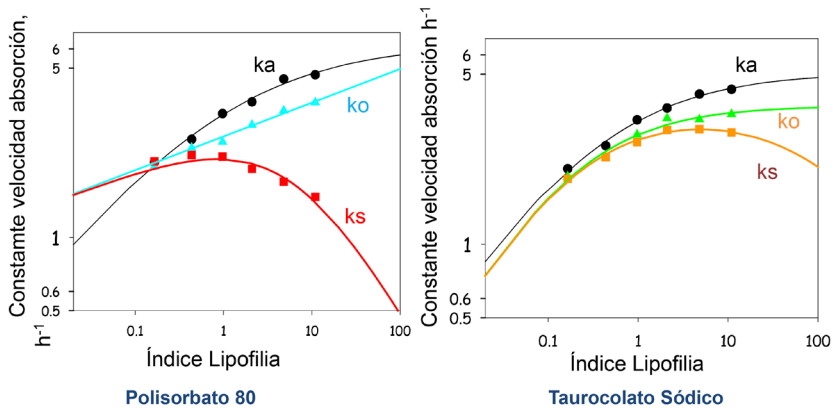


Figura 12. Comparación de los efectos de un tensiactivo sintético, polisorbato 80 y una sal biliar como tensiactivo natural

Los estudios de absorción realizados en presencia de tensiactivos en estómago de rata permitieron proponer un mecanismo para el efecto ulcerogénico demostrado por estos aditivos tanto sintéticos como las sales biliares naturales.

En presencia de tensiactivos por debajo de su CMC, las correlaciones obtenidas en estómago pueden ser exponenciales (tensiactivos sintéticos) o hiperbólicas (tensiactivos naturales). Estas últimas se representan en la Figura 13 junto a la correlación obtenida en ausencia de aditivos. En general, hemos observado un aumento global y significativo en todas las constantes de velocidad de absorción. Este hecho sugiere la posibilidad de que los tensiactivos destruyan la barrera hidrófoba, conduciendo a la exposición de la mucosa gástrica al ambiente ácido. Una vez la capa de fosfolípidos ha sido retirada, la membrana lipídica representa la principal resistencia a la difusión en presencia de tensiactivos sintéticos, puesto que éstos reducen de manera efectiva la resistencia acuosa, ello conduce a una relación exponencial; sin embargo, en presencia de tensiactivos naturales, la capa acuosa permanece intacta y las correlaciones son hiperbólicas pero ambos tipos de surfactantes eliminan la capa de fosfolípidos lo que puede explicar su potencial ulcerogénico. Todos estos resultados en combinación con los resultados obtenidos en los ensayos realizados en intestino delgado se resumen en las siguientes conclusiones.

ABSORCIÓN GÁSTRICA EN PRESENCIA DE TAUCOLATO SÓDICO: INTERPRETACIÓN DE SU EFECTO ULCEROGÉNICO

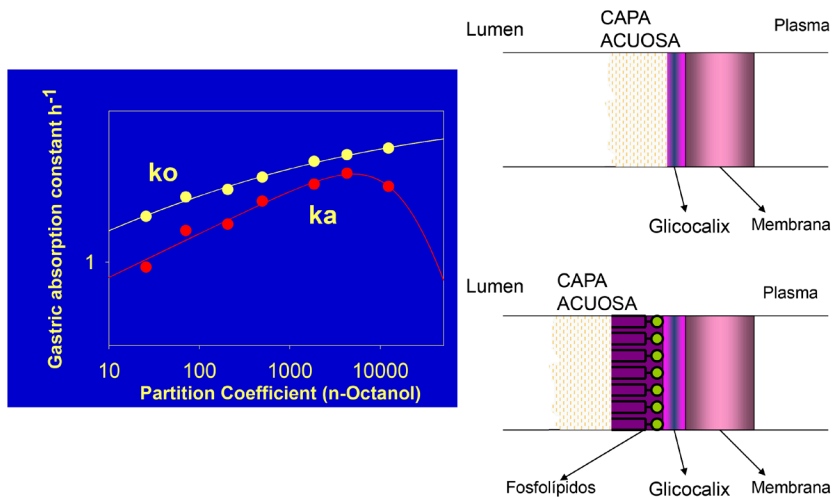


Figura 13. Correlación absorción lipofilia para una serie de ácidos fenilalquilcarboxílicos en ausencia (k_a) y presencia (k_o) de Taurocolato sódico a una concentración inferior a su CMC.

1. Los tensioactivos farmacéuticos eliminan el efecto limitante de la capa acuosa estática en la difusión del soluto hacia la membrana intestinal.
2. Los tensioactivos farmacéuticos incrementan la polaridad de la membrana, haciéndola más permeable para sustancias altamente hidrofílicas.
3. Cuando un tensioactivo sintético es añadido a concentración supramicelar, los efectos anteriores permanecen casi completamente enmascarados por la solubilización micelar de los xenobióticos. En consecuencia, puede producirse un descenso de la permeabilidad aparente del fármaco en función de su reparto en las micelas.
4. Los tensioactivos naturales no eliminan la resistencia de la capa acuosa de difusión posiblemente a su menor capacidad de disminuir la tensión interfacial.
5. La capacidad de solubilización de los tensioactivos naturales es menor que la de los sintéticos debido al menor número de moléculas de surfactante por micela y su estructura más rígida. Esta capacidad de solubilización se incrementa en presencia de fosfolípidos y lecitinas que incrementan el tamaño y la fluidez micelar.

II.- El sistema de clasificación Biofarmacéutica

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutica, (BCS), es un método que permite clasificar los principios activos de acuerdo a su solubilidad acuosa y su permeabilidad intestinal y que sirve en primer lugar como herramienta para entender los factores limitantes de la absorción oral y en segundo lugar para establecer cuando los ensayos de disolución *in vitro* pueden utilizarse como predictivos del comportamiento *in vivo*. El BCS considera la permeabilidad intestinal y la solubilidad acuosa en combinación con la velocidad de disolución como los tres factores más importantes que modulan la velocidad y cuantía de la absorción de un principio activo y por tanto su biodisponibilidad a partir de formas farmacéuticas sólidas de uso oral de liberación inmediata.

Fundamentos teóricos del BCS

La “primera ley de la absorción” se basa en considerar el proceso de permeación a través de la membrana intestinal en términos difusionales. Si se considera la primera ley de Fick para definir la velocidad de difusión a través de la membrana tal y como se representa en la Figura 14, suponiendo el intestino como un tubo de radio R y longitud L en el cual la forma farmacéutica libera el fármaco, que se disuelve en los fluidos intestinales produciendo un determinado perfil de concentración en la vecindad de la membrana intestinal, el proceso de absorción está definido por la siguiente ecuación:

$$J=Pe_{eff} \cdot C_w \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

Pe_{eff} = Permeabilidad efectiva

J = Flujo de difusión a través de la pared intestinal (masa/área/tiempo).

C_w = Concentración del fármaco en la vecindad de la membrana.

Fundamentos teóricos del BCS

"Primera ley de la absorción de fármacos"

$$J = \frac{1}{A} \frac{dM}{dt} = P_{\text{eff}} \cdot C_w$$

La máxima absorción se produce cuando $C_w = C_s$, la solubilidad del compuesto.

$$J^{\text{Max}} = P_{\text{eff}} \cdot C_s$$

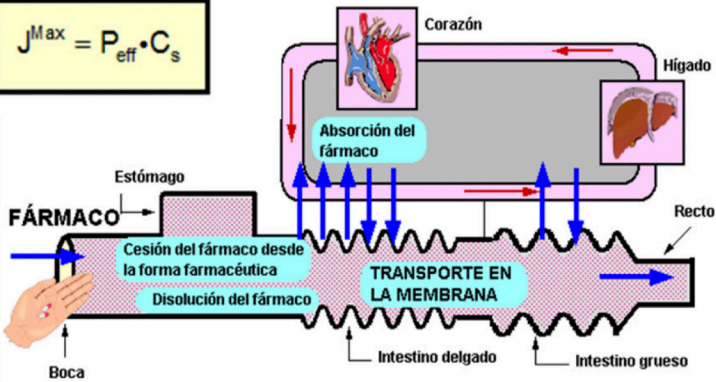


Figura 14. Representación del flujo del fármaco a través de un segmento intestinal. Tomado de Amidon y Bermejo *Modern Biopharmaceutics Versión española* 6.0 2005.

Adicionalmente del esquema anterior puede deducirse el siguiente principio.

Si dos medicamentos que contengan el mismo principio activo producen el mismo perfil de concentración a lo largo del tiempo en la vecindad de la membrana intestinal, tendrán la misma velocidad y magnitud de absorción y serán por ello necesariamente bioequivalentes⁶.

Dos condiciones adicionales deben cumplirse para que la afirmación anterior sea cierta y es que la velocidad de disolución *in vivo* de ambas formulaciones es la misma en todas las condiciones lumbales y que ninguna de ellas contenga excipientes que puedan alterar la permeabilidad o la velocidad de tránsito intestinal. En resumen, se concluye que la solubilidad, la permeabilidad intestinal y la velocidad de disolución son los principales factores biofarmacéuticos que afectan la velocidad y la magnitud de absorción intestinal de un fármaco.

6 Amidon G. et al. *Pbarm Res* 12, 1995,413-420

Por ello el sistema de clasificación biofarmacéutica, BCS. Clasifica los principios activos en cuatro clases según dos posibles niveles (alto o bajo) de estos dos factores, permeabilidad y solubilidad.

Clases del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS) e implicaciones farmacéuticas.

La combinación de estos dos factores y sus dos niveles conduce a las cuatro clases del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS). Por definición en el BCS un fármaco es altamente soluble si la mayor dosis administrada es totalmente soluble en 250 mL. Este volumen no es arbitrario, es precisamente el del vaso de agua con el que se administra la medicación oral en los ensayos clínicos, en particular en los de bioequivalencia, y además es una estimación conservadora del promedio de volúmenes acuosos presentes en el tracto gastrointestinal. Un fármaco es altamente permeable si su fracción oral absorbida es mayor del 85 % (en ausencia de limitaciones debido a solubilidad o disolución).

De esta forma, en base a su clase BCS, es sencillo identificar los factores limitantes de la absorción y establecer cuando será posible encontrar correlaciones entre la disolución *in vitro* de la forma de liberación inmediata y su absorción *in vivo* según se resume en el Cuadro 1.

<p>Clase 1. Alta Solubilidad, Alta Permeabilidad El vaciado gástrico es el limitante de la absorción si la disolución es rápida. Si la disolución es rápida en todas las condiciones lumbinales la formulación de liberación inmediata se comporta como una solución (para las que se eximen los estudios de Bioequivalencia) <u>Correlaciones IVIVC:</u> No esperables. Sólo si disolución más lenta que vaciado o en formas de Liberación controlada</p>	<p>Clase 2. Baja Solubilidad, Alta Permeabilidad. La absorción está limitada por la disolución <i>in vivo</i>. Si existe una correlación <i>in vitro-in vivo</i> validada se pueden comparar formulaciones con el ensayo validado de disolución. <u>Correlaciones IVIVC:</u> posibles incluso para formas de liberación inmediata si el método <i>in vitro</i> reproduce la disolución <i>in vivo</i>.</p>
<p>Clase 3. Alta Solubilidad, Baja Permeabilidad El factor limitante es la permeación y depende menos de la formulación (en ausencia excipientes que afecten a la misma). Como los clase 1 si la disolución es muy rápida se comportan como disoluciones y se puede eximir el estudio de bioequivalencia <i>in vivo</i> y realizarlo <i>in vitro</i>.</p>	<p>Clase 4. Baja Solubilidad, Baja Permeabilidad. Solubilidad y permeabilidad son ambos factores limitantes. <u>Correlaciones IVIVC:</u> No esperables aunque requiere estudios caso a caso dependiendo de que factor predomine en la limitación a la absorción.</p>

Cuadro 1. Características de las 4 clases del BCS, posibilidad de realización de ensayos *in vitro* de Bioequivalencia (Bioexenciones) y de establecimiento de correlaciones *in vitro-in vivo*.

Los principios científicos del BCS se reflejan en las guías tanto de la FDA⁷ como de la EMA⁸ con objeto de establecer el método más apropiado para establecer la bioequivalencia entre formulaciones farmacéuticas orales de liberación inmediata de un mismo principio activo. En estas guías se introduce el concepto de bioexención (“Biowaiver”) entendiéndose como tal la posibilidad de realizar los estudios de bioequivalencia mediante comparación de perfiles de disolución *in vitro*. Es decir, se exime del uso de datos en humanos y se autoriza su sustitución por datos *in vitro* de disolución aunque en última instancia la bioequivalencia entre las dos formulaciones debe quedar establecida. Aunque el debate científico continúa abierto sobre qué clases del BCS y en qué condiciones serían candidatas a una bioexención, en la actualidad las guías admiten esta alternativa sólo para *principios activos de clase 1 y clase 3 en formulaciones orales de liberación inmediata*. En este caso se acepta que la elevada solubilidad del principio activo y su rápida disolución garantizan que estará disuelto antes de vaciar del estómago, de forma que es éste parámetro fisiológico el que limita la absorción y por tanto al llegar disuelto al intestino desde ambas formulaciones en comparación nada se opone a admitir que serán bioequivalentes. Lo que debe establecerse a continuación es cuales son los límites formales para realizar la clasificación y de qué manera debe llevarse a cabo el ensayo de bioequivalencia *in vitro*.

7 FDA. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System Guidance for Industry. <https://www.fda.gov/media/70963/download>

8 EMA. Guideline on the Investigation of Bioequivalence. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-bioequivalence-rev1_en.pdf

Bioequivalencia *in vitro* e *in silico*

Bioequivalencia In vitro: Bioexenciones

La posibilidad de demostrar la bioequivalencia y por tanto garantizar la calidad de los medicamentos accesibles a la población mediante estudios *in vitro* de disolución en base a los criterios científicos del BCS es un aspecto de especial relevancia para los países en vías de desarrollo. Por otro lado han de considerarse las implicaciones éticas de realizar un estudio en voluntarios humanos cuando desde el punto de vista científico no es esencial para el objetivo final (demostrar la bioequivalencia). En cierta manera el BCS supone la aplicación de la política de las tres R (reducir, refinar, reemplazar) nacida para la experimentación animal, a la experimentación en humanos. Por ello, un análisis relevante es evaluar cuantos principios activos serían potenciales candidatos a las mencionadas bioexenciones.

Con este fin se realizó una clasificación provisional de los principios activos contenidos en la lista de medicamentos esenciales de la Organización Mundial de la Salud, OMS. La clasificación se realizó a partir de datos de solubilidad obtenidos de fuentes bibliográficas fácilmente accesibles y de los datos de permeabilidad humana de 29 fármacos modelo y su correlación con sus coeficientes de reparto.

Tomando el dato de solubilidad se calcularon los números de dosis de los 123 principios activos contenidos en los medicamentos orales de liberación inmediata de la lista. Se encontró un 67% de fármacos con $Do < 1$, es decir de alta solubilidad.

Para la clasificación de permeabilidad se tomó la correlación entre las permeabilidades humanas conocidas de 29 fármacos y su Log P o cLogP estimado. Se tomó como referencia el metoprolol y se clasificó como de alta permeabilidad a todos aquellos fármacos cuyo LogP o cLogP fuera superior al del metoprolol.

Un total de 53% (43.1%) y 62 (50.4%) fármacos presentaban LogP y cLogP respectivamente superiores al metoprolol y se consideraron de alta permeabilidad.

Como se muestra en la Figura 15 los porcentajes promedios (según se

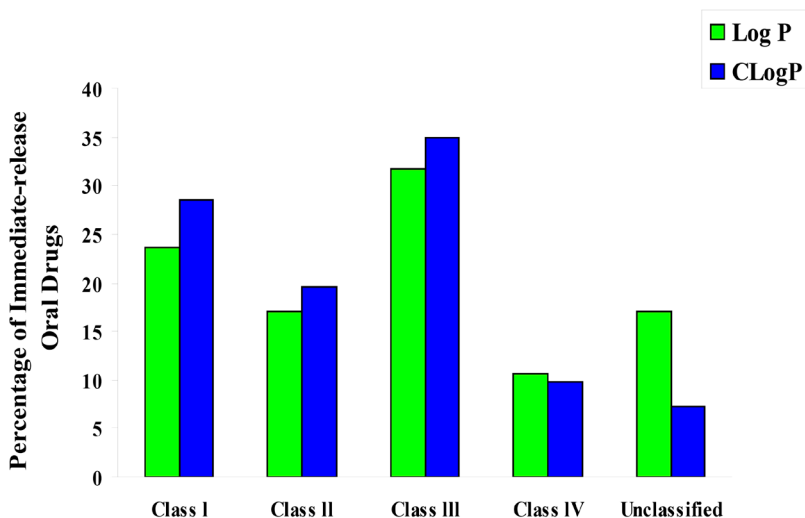


Figura 15. Distribución por clases del BCS de los medicamentos orales de liberación inmediata incluidos en la lista de medicamentos esenciales de la OMS.

use LogP o CLogP) de fármacos en cada clase del BCS hallados fueron los siguientes: 23% de clase 1, 17% de clase 2, 32% en la clase 3, 11% en clase 4 y un 17% quedó sin clasificar por no poder calcular su LogP o cLogP.

Resultados muy similares fueron obtenidos por otros autores que recopilieron datos experimentales de solubilidad y permeabilidad de diversas fuentes bibliográficas⁹. Estos resultados sugieren que de admitirse las bioexenciones para los fármacos clase 3 como propone el reciente documento de la OMS y ya se ha implementado en algunos países latinoamericanos y la propia guía de la EMA (European Medicines Agency) un 55% de los fármacos esenciales de la OMS serían candidatos a demostrar su bioequivalencia *in vitro* lo que comporta repercusiones éticas y económicas importantes en los países en vías de desarrollo para los que es necesario garantizar la accesibilidad de su población a los medicamentos sin perder las garantías esenciales de calidad.

⁹ Lindenberg M, Kopp S, Dressman JB. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004 Sep;58(2):265-78.

Biosimulación In silico de ensayos de Bioequivalencia.

Las recomendaciones actuales de las guías europeas y americanas sobre los estudios de bioequivalencia presentan discrepancias en cuanto a la selección del analito en aquellos fármacos que presentan metabolitos activos, en particular si el sistema farmacocinético pierde la linealidad debido al paso metabólico. Dichas recomendaciones se basaron en estudios previos de biosimulación en los que el modelo cinético utilizado presentaba a nuestro juicio defectos estructurales o no reflejaba la realidad fisiológica. Por ello decidimos diseñar un nuevo modelo semifisiológico representado en la Figura 16 que a diferencia de los anteriores incluyera

Nuevo modelo para simulaciones ensayos BE: Fármaco-Metabolito

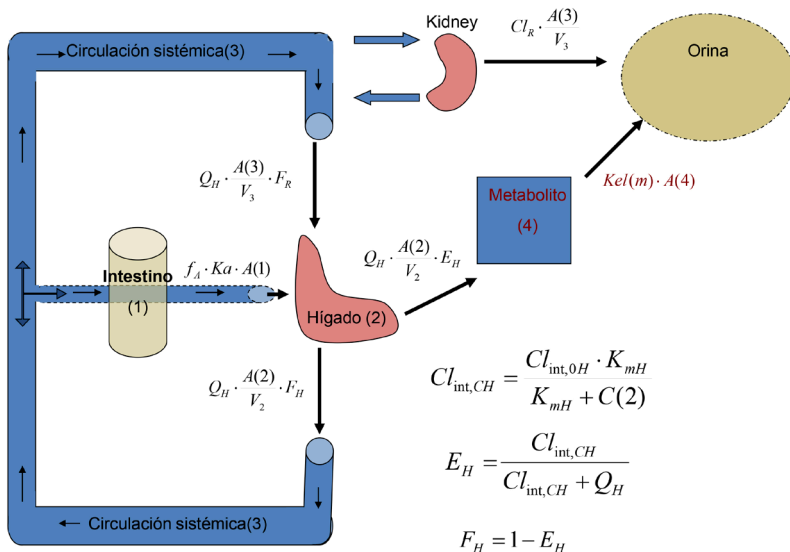


Figura 16. Esquema del modelo farmacocinético utilizado para la simulación de ensayos clínicos de bioequivalencia con seguimiento del fármaco padre y su metabolito. Posteriores modelos incorporaron varias vías metabólicas y metabolitos secundarios.

1. Compartimento intestinal, hepático y plasmático para padre y metabolito.
2. En el lumen intestinal fármaco en forma sólida, disuelta y posibilidad de degradación luminal.

3. Tiempo de tránsito como límite para el proceso de absorción.
4. Proceso de recirculación del fármaco a través del órgano metabolizador.
5. Posibilidad de metabolismo lineal o no lineal cambiando el valor de la K_m .

Para diseñar los escenarios se consideraron las 4 clases del BCS, la posibilidad de que el fármaco tuviera alto o bajo aclaramiento intrínseco, alta o baja variabilidad y se consideraron 6 tipos de productos problema de calidad decreciente (menor velocidad de disolución) con respecto al producto de referencia.

En la Figura 17 se esquematizan algunos de estos escenarios. Todos estos escenarios se utilizaron para simular los niveles plasmáticos del fármaco padre y metabolito en 1000 estudios de bioequivalencia con 24 sujetos por estudio añadiendo la variabilidad estándar los parámetros cinéticos y a partir

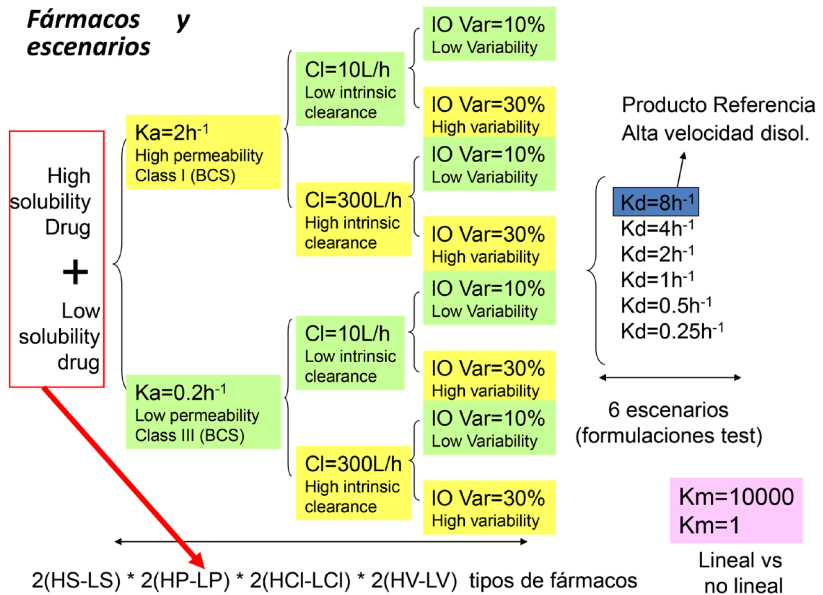


Figura 17. Resumen de algunos de los escenarios utilizados para la simulación de los ensayos de bioequivalencia que incluyen las 4 clases del BCS, dos niveles de aclaramiento intrínseco, dos niveles de variabilidad, escenarios en situación lineal o no y diferentes calidades de la formulación problema.

de las curvas se estableció el cociente entre los parámetros de interés, es decir Cmax y AUC de los dos analitos a fin de determinar cuál de los dos detectaba antes la pérdida de calidad de la formulación problema.

Adicionalmente todas las simulaciones se repitieron en condiciones de dosis múltiples tras alcanzar el estado estacionario.

La novedad de estas simulaciones es que el modelo cinético utilizado es más próximo a la realidad fisiológica y se ha estudiado de manera simultánea factores que en las simulaciones previas se analizaron de manera separada como el alto o bajo aclaramiento intrínseco o diferentes valores de fracción absorbida.

Las conclusiones fundamentales de todas estas simulaciones corroboraron que en la mayoría de los casos el fármaco padre en diseño a dosis única es el mejor analito que refleja la calidad de la forma farmacéutica. No obstante, se detectaron escenarios particulares como los fármacos con bajo aclaramiento intrínseco en situación no lineal en los que el estado estacionario es el diseño de elección con el fármaco padre como analito. Los resultados de los diversos escenarios pueden consultarse en la bibliografía relevante sobre este tema incluida al final de este documento.

El intestino *in vitro*

Los ensayos de disolución de formas farmacéuticas se han usado de manera rutinaria para el control de calidad de las mismas, aunque dichos ensayos, en aparatos descritos en las farmacopeas -como el aparato de cestillos o paletas-, no necesariamente permiten predecir el comportamiento *in vivo*. Estos dispositivos no reflejan las características fisiológicas del tracto gastrointestinal, como los volúmenes de fluidos o los cambios dinámicos de pH. En las últimas décadas con objeto de obtener dispositivos capaces de mimetizar la disolución en el intestino humano se han desarrollado diversos aparatos entre los que destaca el simulador gastrointestinal (GIS) de la Universidad de Michigan que se representa en la Figura 18

El dispositivo contiene 3 cámaras de disolución que simulan el estómago, duodeno y yeyuno y dos reservorios de secreciones gástricas y duodenales. Las secreciones se bombean a 1 ml/min. El estómago se vacía en el duodeno con una cinética de primer orden de semivida 13 min. El volumen del

duodeno se mantiene constante en 50 mL mediante la transferencia de su con-

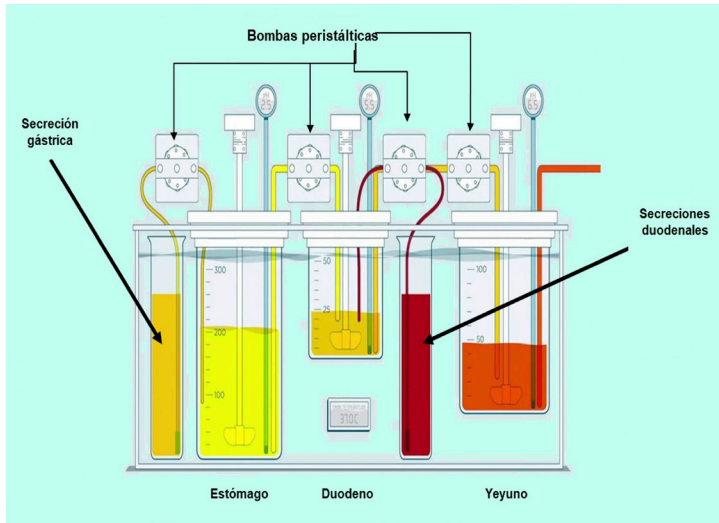


Figura 18. Estructura del simulador gastrointestinal GIS.

tenido al yeyuno. El sistema se mantiene bajo agitación discontinua y atemperado a 37°C. El pH se monitoriza en las 3 cámaras.

Este dispositivo permite simular la disolución en estómago en un volumen de fluido más parecido al contenido del estómago tras ingerir un vaso de agua, el vaciado del fluido y las partículas en suspensión en el duodeno con el cambio de pH consecuente (por la neutralización gracias a las secreciones duodenales) y su posterior tránsito a yeyuno. El tránsito entre los tres compartimentos y los cambios de pH dinámicos son especialmente importantes para simular la disolución *in vivo* de bases débiles que pueden sufrir fenómenos de sobresaturación tras el vaciado gástrico y posterior precipitación en intestino.

En la siguiente Figura se muestra como las fracciones disueltas en las tres cámaras permitieron mediante convolución matemática predecir los niveles plasmáticos de posaconazol de diferentes formulaciones de esta base tras su administración en voluntarios sanos

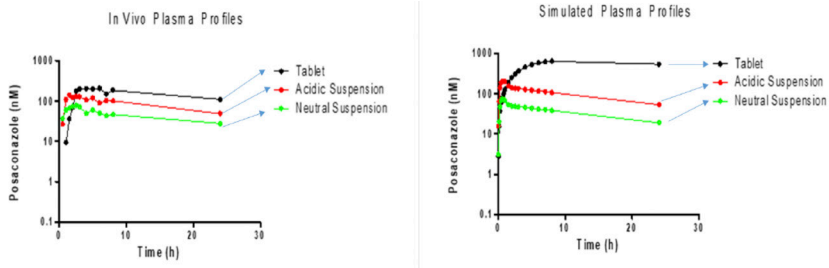
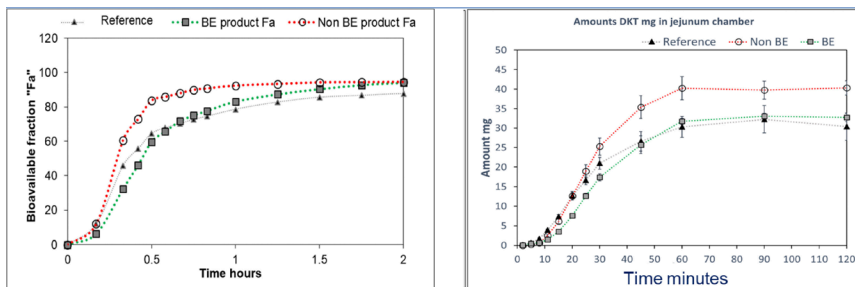


Figura 19. Niveles plasmáticos de tres formulaciones de posaconazol en comprimido, suspensión neutra y suspensión acidificada en voluntarios sanos (gráfica izquierda) y niveles plasmáticos predichos mediante convolución de las concentraciones disueltas *in vitro* en el dispositivo GIS.

Asimismo, ha sido posible reproducir la disolución *in vivo* de la sal de un ácido débil: Desketoprofeno trometamol. Para este fármaco se disponía de datos de dos ensayos de Bioequivalencia en humanos. En uno de los ensayos se demostró bioequivalencia pero en el otro la formulación problema falló el ensayo. Como se observa en la Figura 20 las fracciones disueltas en la cámara yeyuno del GIS se corresponden con las fracciones absorbidas calculadas a partir de los niveles plasmáticos mediante deconvolución. Las fracciones disueltas y absorbidas son prácticamente superponibles.

Similar capacidad predictiva del comportamiento *in vivo* se ha demos-



In vivo absorption

In vitro GIS dissolution

Figura 20. Fracciones disueltas *in vitro* en el dispositivo GIS en yeyuno (gráfica derecha) y fracciones absorbidas calculadas a partir de los niveles plasmáticos de dos estudios de bioequivalencia.

trado para otros principios activos como dipiridamol¹⁰, ketokonazol¹¹, itraconazol¹² o dasatinib¹³.

Las repercusiones prácticas del desarrollo de estos sistemas para la industria farmacéutica son notables dado que suponen una herramienta de desarrollo de formulaciones a fin de seleccionar aquellas con predicciones de un mejor rendimiento *in vivo* y en el caso de validarse la correlación *in vitro-in vivo* como las mostradas en los ejemplos el ensayo de disolución permitiría el remplazo del estudio de bioequivalencia en humanos según se describe en las guías de la EMA y la FDA.¹⁴

III.- Observando en directo el intestino

Estudios de intubación en humanos

El diseño de un dispositivo que mimetice el proceso de disolución intestinal requiere un detallado conocimiento de las variables fisiológicas implicadas en el proceso. Para ello la observación directa del mismo mediante estudios de intubación realizados en voluntarios sanos es una de las alternativas experimentales de elección. Con esta finalidad la FDA financió sendos proyectos de investigación dirigidos por la universidad de Michigan, uno centrado en el estudio en humanos y otro en el dispositivo *in vitro*¹⁵. Se diseñó un estudio clínico para observar los procesos luminales mediante un tubo diseñado al efecto que permite simultáneamente la toma de muestras de fluidos intestinales y las medidas manométricas de presión.

El análisis de los fluidos luminales permite la determinación de su pH a cada tiempo de muestreo, la medida de la concentración de fármaco en diso-

10 Matsui K, et al. *Mol Pharm.* 2017 Apr 3;14(4):1181-1189

11 Tsume Y et al. *Eur J Pharm Sci.* 2017;102:126-139

12 Matsui K, et al. *J Pharm Sci.* 2016;105(9):2804-2814.

13 Tsume Y et al. *Eur J Pharm Sci.* 2015;76:203-12.

14 Gonzalez-García I. et al. *Drug Dev Ind Pharm.* 2015;41(12):1935-47

15 *Innovations in Regulatory Science: In Vivo Predictive Dissolution (iPD) to Advance Oral Product Bioequivalence (BE) Regulation : Grant reference HHSF 223201510157C*

lución y total, la estimación de la capacidad tamponadora de los fluidos y la medida de la concentración del marcador no absorbible administrado junto al fármaco. Las medidas manométricas con el tratamiento adecuado permiten la identificación de la fase de motilidad, la identificación de las contracciones fase III post dosis (la onda de vaciado gástrico) y la caracterización de otros índices de motilidad.

El medicamento seleccionado para este estudio fue el Ibuprofeno en comprimidos orales de liberación inmediata a una dosis de 800 mg que se administró en ayunas y en presencia de una dieta líquida acompañado de 250 ml de agua con una concentración conocida de rojo de fenol como marcador no absorbible. Se tomaron muestras de estómago, duodeno y yeyuno durante un periodo de 8 horas y en cada voluntario asimismo se midieron sus concentraciones plasmáticas durante el mismo periodo.

El estudio de la evolución de las concentraciones de rojo de fenol en los tres segmentos intestinales permitió mediante un modelo matemático mostrar que el estómago no se comporta como un único compartimento homogéneo a partir del cual se produce en vaciado mediante una cinética de primer orden. Esta estructura es la implementada en la mayor parte de programas de modelado cinético fisiológico. En el estudio se observó que desde la primera toma de muestra la concentración de rojo de fenol observada en estómago se encontraba muy por debajo de la concentración administrada mientras que en duodeno se observaba una aparición casi inmediata de concentraciones muy elevadas.

Después de construir modelos compartimentales de complejidad creciente se demostró que el que mejor reproducía los resultados experimentales era un modelo de estómago con dos compartimentos, cuerpo y antro y una porción del fluido ingerido que se vaciaba de manera rápida en duodeno sin transitar por cuerpo y antro. A esta porción del flujo se la denominó "Bypass". Un fenómeno similar se había observado en presencia de alimentos, pero nunca hasta ahora se había descrito en ayuno. En la Figura 21 se observa las concentraciones de Rojo fenol experimentales en los tres segmentos, los valores predichos por el modelo y la estructura del mismo.

Se observó adicionalmente que la fracción de fluido que escapaba rápidamente hasta el duodeno dependía de la fase de motilidad del voluntario considerado. Aquellos voluntarios que presentaron tiempos hasta la fase 3 de contracciones gástricas de vaciado post dosis (TMMC) más cortos, es decir

estaban en un periodo de motilidad alta, tuvieron fracciones de bypass más elevadas. La aplicación práctica de este modelo ha consistido en el cálculo (indirecto a través de las concentraciones de rojo fenol) de los volúmenes de fluidos en cada compartimento y su evolución con el tiempo. Esta información se incorporará en el simulador gastrointestinal (GIS) para optimizar las velocidades de flujo de las bombas y la geometría de los compartimentos *in vitro*.

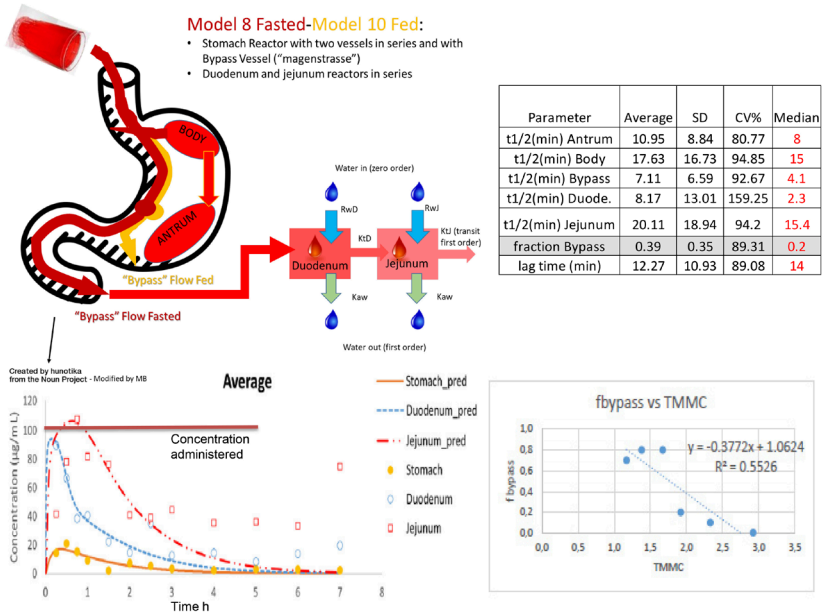


Figura 21. Estructura del modelo cinético compartimental diseñado para explicar la evolución de las concentraciones de rojo fenol en el estómago, duodeno y yeyuno de voluntarios humanos. Se muestran los parámetros de velocidad de tránsito en forma de semividas y la fracción de fluido que escapa rápidamente hacia el duodeno. Dicha fracción está relacionada con la fase de motilidad del voluntario.

Respecto al Ibuprofeno, se consiguieron datos de concentraciones en estómago, duodeno, yeyuno y plasma para cada voluntario y se realizó un análisis preliminar para explorar la relación entre la disolución *in vivo* y las variables fisiológicas que se midieron simultáneamente como pH, motilidad y capacidad tamponadora de los fluidos.

El análisis preliminar mostró una clara asociación entre las concentraciones disueltas de Ibuprofeno en intestino y la evolución temporal del pH en cada segmento. Por otra parte, por primera vez se demostró a través de datos

in vitro que las velocidades de absorción en plasma son proporcionales a las concentraciones disueltas del fármaco que determinan el gradiente para la difusión a través de la membrana intestinal.

En la Figura 22 se observa la evolución temporal de los valores de pH promedios en duodeno y yeyuno representados junto a las concentraciones promedias de ibuprofeno disuelto en ambos compartimentos. En la gráfica de la derecha se superponen los valores de pH promedios en intestino, las concentraciones promedias en intestino y las velocidades de absorción obtenidas por deconvolución desde los niveles plasmáticos. La línea vertical indica el tiempo al que en promedio se produce la onda de vaciado gástrico y se observa que las concentraciones máximas tanto en intestino como en plasma se producen tras ese instante indicando que el vaciado determina la llegada de una fracción importante de la dosis al intestino en ese instante en donde el pH para su disolución es más favorable gracias a la coordinación del complejo motor-secretor.

En resumen, este estudio ha permitido demostrar por primera vez de

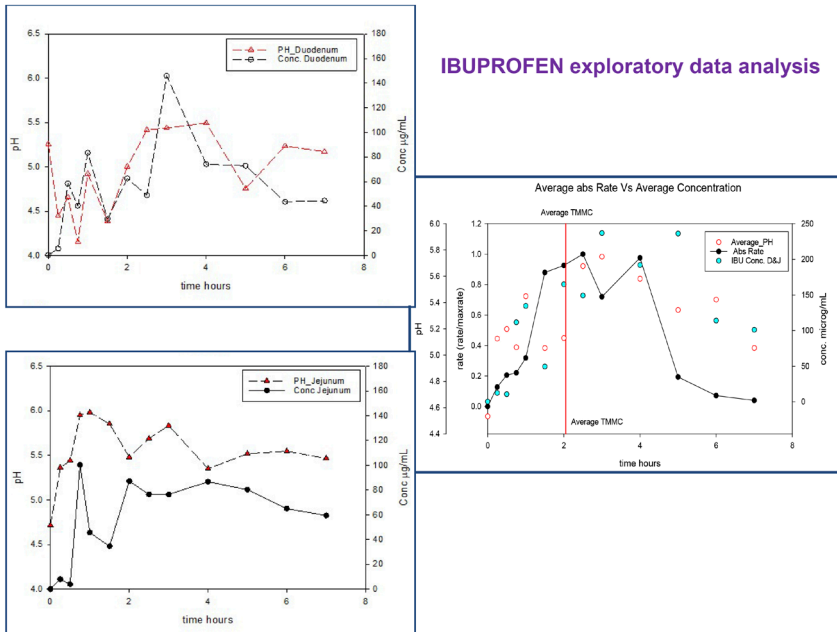


Figura 22. Análisis preliminar de las concentraciones intestinales de ibuprofeno y parámetros fisiológicos como el pH y la motilidad.

manera experimental que la disolución *in vivo* del ibuprofeno (fármaco clase 2 ácido) depende del pH de los fluidos luminales y de la fase de motilidad en el momento de la administración. En particular, la onda de vaciado en fase III (“housekeeper wave”) determina la llegada de una fracción importante de la dosis del fármaco en estado sólido al intestino delgado donde su disolución genera la fuerza motriz para la absorción. Esta información, junto con los parámetros obtenidos en el modelado cinético de los datos servirán para la mejora del simulador gastrointestinal *in vitro* (GIS) así como de los programas de modelado cinético-fisiológico.

B. El cerebro, la fortaleza derrotada.

El acceso de un fármaco o de un componente funcional al Sistema Nervioso Central (SNC) puede ser vital si su receptor diana se encuentra allí localizado o por el contrario, un fenómeno no deseable si dicha sustancia origina efectos secundarios a nivel cerebral. La efectividad de los nuevos principios activos y nutracéuticos se relaciona directamente con su interacción con la barrera hematoencefálica (BBB) y su acceso a rutas bioquímicas a nivel central.

Del mismo modo que en la actualidad ya se dispone de modelos *in vitro* capaces de simular otras barreras fisiológicas como la gastrointestinal o la membrana del epitelio renal, también se han realizado numerosos intentos de encontrar modelos *in vitro* para la BBB cuya estructura fisiológica se muestra en la Figura 23. Generalmente se trata de cultivos de células endoteliales cerebrovasculares de diversos animales como ratas, cerdos, ovejas, vacas y también humanas. Si bien estos cultivos son complejos y laboriosos, presentan elevada variabilidad y las uniones intercelulares *in vitro* no presentan la misma

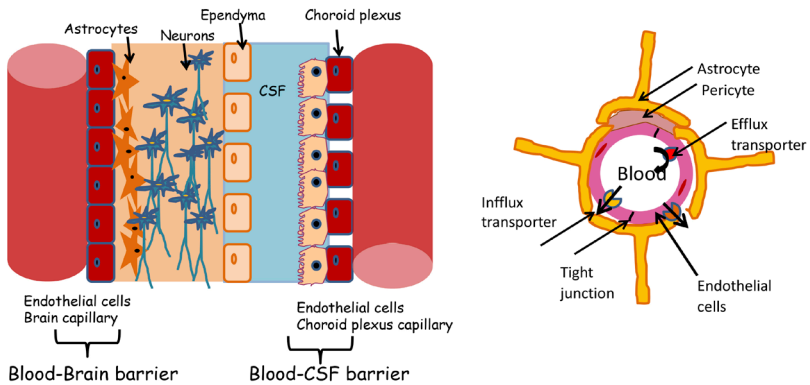


Figura 23. Esquema de la Barrera hematoencefálica (BBB) y de la Barrera sangre-fluido cerebrospinal (CSF)

integridad que *in vivo*.

Los cultivos celulares presentan diversas ventajas para el estudio de la penetración a nivel del SNC de xenobióticos entre ellas la reducción del tiempo, coste y controvertida experimentación animal y la posibilidad de automatizar los ensayos para integrarlos en sistemas de alta capacidad de cribado (high-throughput screening) que se utilizan en la industria farmacéutica para discernir entre cientos de candidatos posibles.

Modelos *in vitro*

Los parámetros relevantes para establecer el grado de acceso de un fármaco al SNC son la permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica (o el producto PS) la fracción libre en plasma, f_u (disponible para atravesar la barrera), el volumen de distribución en el SNC, V_u y el coeficiente de reparto cerebro/plasma (cociente de las concentraciones correspondientes, K_p) y su logaritmo (Log BB) Estos parámetros requieren tres sistemas experimentales diferentes para su determinación dificultando el cribado rápido de moléculas. Uno de los objetivos de nuestra investigación se centra en desarrollar un sistema experimental modificado, basado en las monocapas celulares que permita predecir simultáneamente PS, f_u , V_u y K_p .

El coeficiente K_p se usa habitualmente como indicativo de la magnitud de acceso al SNC, sin embargo, K_p representa el reparto del fármaco a cerebro y no necesariamente es indicativo de las concentraciones de fármaco libre en fluido intersticial (K_p uu) que es el parámetro de interés farmacológico.

Con el fin de obtener los valores de K_p uu a partir de los datos de K_p y de fracción libre f_u es necesario un tercer parámetro V_u brain según la siguiente ecuación:

$$K_{p,uu} = \frac{C_{u,brainISF}}{C_{u,plasma}} = \frac{A_{brain} / V_{u,brain}}{C_p \cdot f_u} = \frac{K_p}{f_u \cdot V_{u,brain}}$$

Ecuación 2

Donde V_u brain representa el volumen aparente de distribución o en otras palabras la relación entre la cantidad de fármaco en cerebro (A brain) y la concentración libre de fármaco (su interpretación es análoga al Volumen de distribución aparente V_{ss} en farmacocinética donde no representa un volumen acuoso real sino el cociente entre cantidad en organismo y concentración plasmática en estado estacionario). Ello implica que para obtener valores de K_p u u y PS son necesarios cuatro sistemas experimentales, uno para K_p otro para f_u , otro para V_u brain y otro para PS.¹⁶¹⁷

El esquema del sistema *in vitro* propuesto por nuestro grupo utilizando monocapas Caco-2, MDCK y MDCK-Mdr1 se muestran en la siguiente Figura 24.

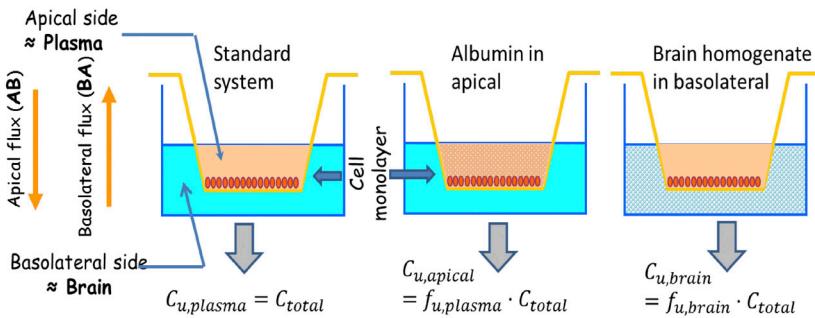


Figura 24. Esquema del sistema con monocapas celulares propuesto como modelo de la BBB

Experimentos estándar. En un experimento *in vitro* en monocapas celulares estándar o clásico se realizan estudios en ambas direcciones, desde la cámara basal a –apical (Pba) y de apical a basal (Pab).

Experimentos en presencia de albúmina. La concentración de albúmina es de 4% para que esté en porcentaje similar a la sangre humana. La solución de fármaco con albúmina se coloca en la cámara apical (compartimento de la sangre). Estos experimentos de transporte en presencia de albúmina se

16 De Lange EC. The mastermind approach to CNS drug therapy: translational prediction of human brain distribution, target site kinetics, and therapeutic effects. *Fluids and barriers of the CNS*, 2013; 10(1): 12.

17 Fridén M, Gupta A, Antonsson M, Bredberg U, Hammarlund-Udenaes M. In vitro methods for estimating unbound drug concentrations in the brain interstitial and intracellular fluids, *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 2007; 35(9):1711-9.

llevan a cabo en las células MDCKII y MDCKII-MDR1 en dirección AB.

Experimentos con homogeneizado de cerebro. El homogeneizado de cerebro se mezcla con tampón de fosfato (pH 7,4 180 mM) en diferentes proporciones (1: 3; 1: 1 y 1: 4) para obtener la dilución adecuada de homogeneizado de cerebro. El homogeneizado de cerebro se coloca en la cámara basolateral en los experimentos con células MDCKII y MDCKII-MDR1.

Cuando los experimentos se realizan al mismo pH en ambas cámaras, el ratio de la permeabilidad basal-apical (PBA) y permeabilidad apical-basal (PAB) se puede utilizar para detectar la presencia de transportadores involucrados en el paso de la sustancia a ensayar a través de la membrana. Se considera que existe un transportador de secreción involucrado en la paso del fármaco cuando $(PBA / PAB > 2)$ o mecanismos de transporte mediados por portadores de absorción $(PBA / PAB < 0,8)$.

La estimación de los parámetros relevantes a partir del modelo experimental se realizó para un grupo de 10 fármacos del siguiente modo

- El parámetro fu *in vitro* p se obtiene de la relación de la permeabilidad obtenida en la dirección AB en los experimentos de albúmina, Papp ALB, y la permeabilidad en la dirección AB en el experimento estándar, Papp A►B,
- El parámetro fu *in vivo* p, está relacionado con la concentración de fármaco no unido en el cerebro y la concentración total en el cerebro.
- El parámetro fu *in vitro*, b se obtiene a partir de la relación entre los valores de permeabilidad aparente BA obtenidos en presencia de homogeneizado, Papp HOM y Papp B►A la permeabilidad en la dirección basal-apical de los experimentos estándar.
- El parámetro Kp, uu se define como la relación entre la concentración de fármaco no unido en el cerebro y la concentración de fármaco no unido en el plasma en estado estacionario.

Si la difusión pasiva es el único mecanismo implicado en el transporte de fármaco a través de la membrana, Kp, uu es igual a 1. Si Kp, uu es inferior a 1, significa que hay un transportador implicado de favorecer el paso del fármaco del cerebro a la circulación sistémica mientras que si Kp, uu es mayor que

1, significa que existe un mecanismo de transporte que favorece el paso del fármaco de sangre al cerebro.

El parámetro K_p *in vitro*, u_u puede definirse como la relación entre las permeabilidades aparentes apical-basolateral y basolateral-apical que se obtienen en los experimentos estándar.

V_u en el cerebro puede estimarse con la siguiente ecuación

$$V_{u, b} = VECF + (1/f_{u, b}) \cdot VICF$$

Ecuación 3

donde VECF es el volumen del fluido extracelular (líquido intersticial del cerebro) y VICF es el volumen intracelular cerebro. Si el fármaco no se une a ningún componente celular, $f_{u, b}$ es casi 1, y $V_{u, b}$ es igual a $VECF + VICF$, (cuyo valor es aproximadamente $0,8 \text{ ml} \cdot \text{gramo de cerebro}^{-1}$) ($0,2 \text{ ml} \cdot \text{gramo de cerebro}^{-1} + 0,6 \text{ ml} \cdot \text{g cerebro}^{-1}$). Del mismo modo, $V_{u, b}$ es mayor que $0,8 \text{ ml} \cdot \text{gramo de cerebro}^{-1}$ cuando $f_{u, b}$ es pequeño.

Los fármacos utilizados en el estudio cubrían un ámbito amplio de lipofilia y de unión a proteínas plasmáticas y se disponía de datos *in vivo* en humanos de los parámetros a estudio.

La Figura 25 resume las relaciones *in vitro-in vivo* de los parámetros f_u , K_{p_uu} y V_u y demuestra la capacidad del modelo propuesto de predecir estos parámetros *in vivo*.

I.- Caballos de Troya

Nuestro próximo objetivo con este modelo es su mejora, mediante la expresión-en las células utilizadas-de transportadores y receptores presentes en la barrera hemato-encefálica a fin de explorar la creación de los llamados “caballos de Troya”, es decir moléculas híbridas o compuestas por el fármaco y un sustrato del transportador-receptor de interés que son por tanto reconocidos y transportados al otro lado de la membrana donde se regenera el fármaco

(mediante hidrólisis, por ejemplo). Esta estrategia se ha utilizado con éxito en otras barreras como la intestinal, donde los denominados “profármacos” han permitido el incremento de la fracción oral absorbida de moléculas con escasa capacidad de absorción por sus desfavorables propiedades físico-químicas.

Acceso al SNC: Cruzando la BBB

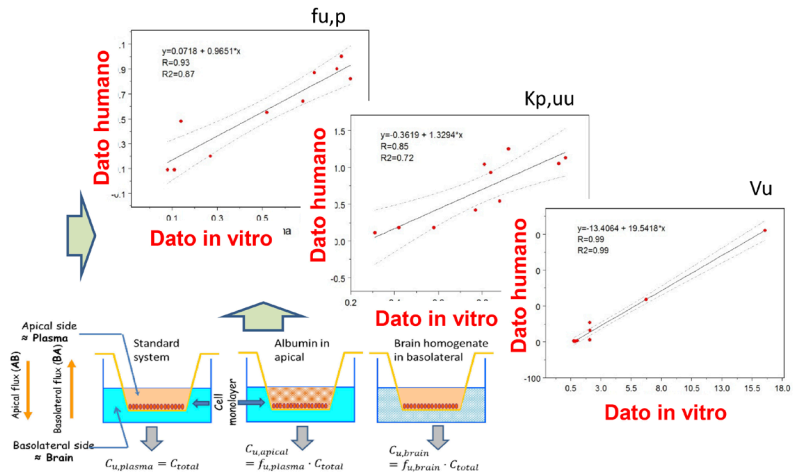
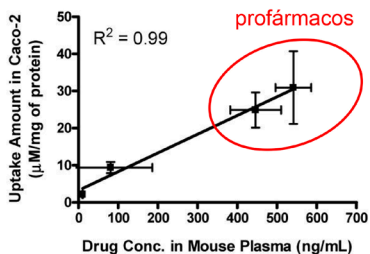
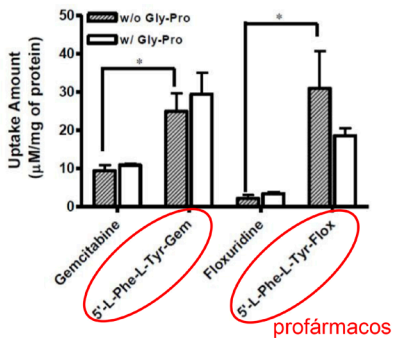
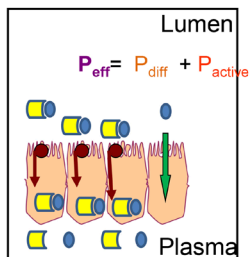
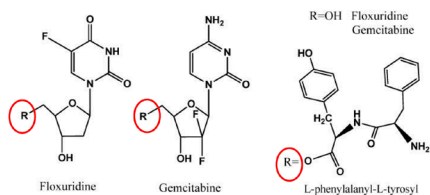


Figura 25. Resumen de los resultados experimentales obtenidos en el nuevo modelo in vitro propuesto de BBB. Las tres correlaciones in vivo-in vitro obtenidas para f_u , K_{p_uu} y V_u muestran la capacidad predictiva del sistema.

Un ejemplo de esta estrategia que planeamos utilizar en la BBB y se aplicó con éxito en la barrera intestinal se muestra a continuación para ilustrar este concepto.

En la Figura 26 se muestra la estructura química de la Floxuridina y Gemcitabina y del dipéptido utilizado para sintetizar sus dos profármacos. Las moléculas originales debido a sus características fisicoquímicas poseen una permeabilidad por difusión pasiva escasa lo que determina una biodisponibilidad oral baja. El objetivo de esta síntesis de derivados con un dipéptido era incrementar la permeabilidad a través del concurso del transportador de péptidos PEPT1.

Ambos profármacos fueron capaces de incrementar la permeabilidad en células Caco-2 de manera significativa, tanto por incremento del componente difusional como por su afinidad por el transportador de péptidos PEPT1.



Entrada en células Caco-2

Figura 26. Profármacos de Gemcitabina y Floxuridina con afinidad por el transportador de péptidos PEPT1 que demostraron incrementar la permeabilidad tanto *in vitro* en células Caco-2 como *in vivo* en ratones¹⁸

Estos alentadores resultados en el modelo *in vitro* se confirmaron mediante ensayos *in vivo* en ratones. Al administrar los fármacos y los profármacos por vía oral a ratones se encontró una perfecta correlación entre las permeabilidades de los profármacos y el incremento en los niveles plasmáticos con respecto a las moléculas originales¹⁸. Muchos otros receptores endoteliales se están explorando con prometedores resultados¹⁹.

18 Tsume Y, Borrás Bermejo B and Amidon GL. The dipeptide monoester prodrugs of floxuridine and gemcitabine-feasibility of orally administrable nucleoside analogs *Pharmaceuticals (Basel)*, 2014, 7(2):169-91.

19 Julia V. Georgieva JV, Hoekstra D and Zuborn IS. Smuggling Drugs into the Brain: An Overview of Ligands Targeting Transcytosis for Drug Delivery across the Blood-Brain Barrier. *Pharmaceuticals* 2014, 6(4), 557-583

3.- Conocimiento sin fronteras: La biofarmacia como herramienta de desarrollo social.

La investigación y desarrollo de nuevos medicamentos es un proceso complejo y lento con un coste estimado de 1000 millones de dólares y una duración promedio de 12 a 15 años. Por ello, la probabilidad de tener éxito en la búsqueda de nuevas moléculas eficaces y seguras es muy baja y es asequible de manera casi exclusiva a las industrias farmacéuticas fuertes y competitivas de las grandes economías mundiales. No obstante, la industria farmacéutica latinoamericana es un eje de desarrollo esencial, no solo por su potencial económico sino como garante del acceso a la población de medicamentos de calidad, pero simultáneamente accesibles económicamente.

La comercialización de un medicamento seguro y de calidad requiere tres actores: la industria, las autoridades regulatorias y las instituciones de investigación públicas o privadas, entre ellas las universidades como generadoras del conocimiento. Las leyes y normativas referentes al medicamento deben desarrollarse sobre bases científicas y es esencial, asimismo, que estén armonizadas, a fin de facilitar la existencia de mercados comunes como motor económico y mecanismo de integración regional.

La estrategia para armonizar regulaciones en el área del medicamento es formar un grupo de profesionales que, con un lenguaje común, desarrollen su actividad en la industria o en instituciones reguladoras gubernamentales para garantizar que los estándares exigidos son desarrollables por la industria y evaluables con conocimiento por las autoridades.

Sobre esa idea el Instituto de Salud Pública de Chile en la persona de la Dra. Regina Pezoa inició en el año 2003 cursos de formación dirigidos a sus propios miembros, pero también a profesionales en industria farmacéutica y universidad en aspectos como la estabilidad de medicamentos o la evaluación biofarmacéutica. Se desarrollaron así los programas de biofarmacia BP1, BP2, BP3 y BP4 y otros cursos homólogos en Santiago, Valparaíso, Viñas del Mar,

Iquique, San José de Costa Rica, Brasilia, Sao Paulo, Asunción, que permitieron no sólo la capacitación de cientos de profesionales latinoamericanos sino también la creación de una red de contactos entre los docentes y sus instituciones. Ese grupo de trabajo se ha consolidado finalmente en una Red, la Red Biofarma como herramienta de un proyecto de cooperación al desarrollo financiado por el Programa Alfa iii de la Comisión Europea. El objetivo de la Red Biofarma es continuar con la estrategia iniciada con los BP's a través de los programas de formación e investigación propuestos y dejar consolidados en las universidades participantes grupos científicos (destinatarios) que sigan ofertando esa formación a las futuras generaciones de farmacéuticos y otros profesionales de la salud. Sería deseable que la Red pueda extenderse, a través de nuevos proyectos, a otros países de América Latina; contribuyendo así a elevar la competencia de la industria farmacéutica local y su impacto en los sistemas de salud latinoamericanos y en su población en general (beneficiarios finales).

De forma general, como se esquematiza en la Figura 27, los resultados alcanzados en el proyecto Red-Biofarma quieren favorecer la armonización re-

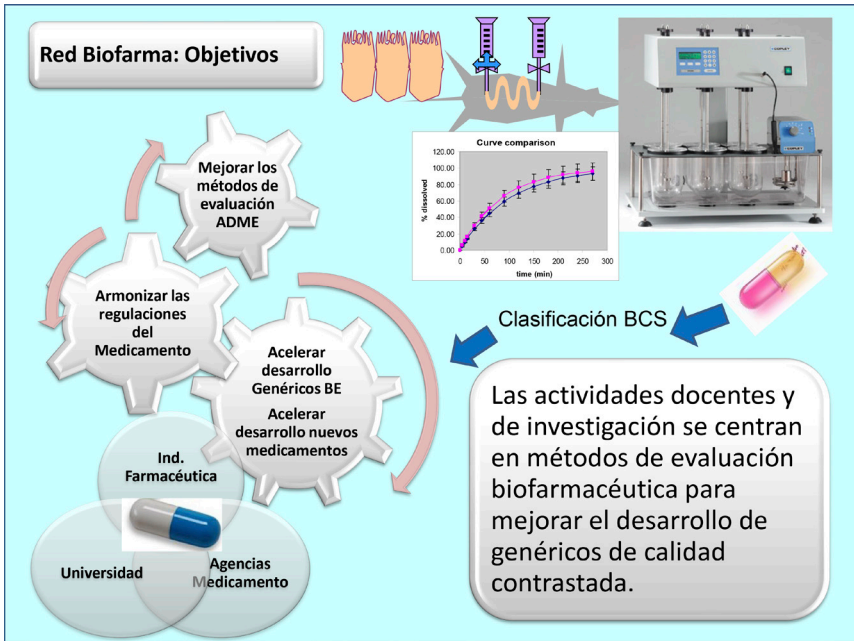


Figura 27. Objetivos generales de la Red Biofarma que utiliza los programas de formación como herramienta de fortalecimiento de la industria farmacéutica en América Latina.

gulatoria en el campo de la bioequivalencia a través de la implementación de los criterios científicos del sistema de clasificación biofarmacéutica (BCS), acelerando la llegada al mercado de medicamentos genéricos (multifuentes) de calidad contrastada y accesibles, contribuyendo a solucionar problemas socia-

La clasificación BCS para promover el acceso a medicinas esenciales. Beneficios:



Valeria Gigante. Technical officer | WHO Biowaiver project - cycle II



Figura 28. Beneficios de la clasificación de principios activos según el BCS con repercusión en diferentes aspectos relacionados con el desarrollo y distribución de medicamentos.

les, beneficiando la salud y la calidad de vida de la población y reforzando la competitividad de la industria farmacéutica de América Latina.

De manera paralela al desarrollo de los Cursos Internacionales de Biofarmacia promovidos por el ISP en Chile, la Agencia Española de Cooperación Internacional apoyó a través de 3 proyectos de investigación la formación docente en Biofarmacia y el equipamiento de un laboratorio de química computacional en la Universidad Central de Las Villas en Cuba que fortaleció la colaboración existente e impulsó el desarrollo de una línea de trabajo de correlaciones estructura absorción orientada al diseño racional de nuevos candidatos a fármacos en enfermedades de alto impacto social. El Profesor Miguel Angel Cabrera Perez, investigador principal del grupo Cubano fue a su vez uno

de los promotores y redactores del proyecto RedBiofarma.²⁰

Todas estas actividades formativas se han materializado en la edición de dos libros, uno en formato CD_Rom editado por la Drug Delivery Foundation²¹ y otro electrónico de la editorial electrónica de la Universidad Miguel Hernández.²²

La relevancia de garantizar la accesibilidad de las medicinas que cumplan los estándares de calidad y bioequivalentes al producto que demostró eficacia clínica en la fase 3 pre-comercialización es un punto en las líneas estratégicas de la Organización Mundial de la Salud que ha iniciado recientemente un proyecto encaminado a la clasificación experimental de los fármacos incluidos en la lista de medicamentos esenciales en formas orales e liberación inmediata.

El primer paso de este proyecto es la determinación de la solubilidad de las sustancias para lo que ha sido necesario definir un protocolo experimental que permita armonizar los resultados en diferentes laboratorios. Nuestro laboratorio participó en la validación inicial de este protocolo y en la actualidad estamos determinando la solubilidad de 15 nuevos compuestos. Aquellos que demuestren alta solubilidad (es decir sean clase 1 o 3 del BCS) podrán beneficiarse en el futuro de la posibilidad de demostrar bioequivalencia in vitro, evitando innecesarios ensayos en humanos con las consecuencias éticas y económicas correspondientes. En la Figura 29 se resumen todos los beneficios derivados de la aplicación del BCS en el desarrollo de medicamentos orales.

20 *Proyectos financiados por la AECl Referencias: D/024153/09; B/020808/09; B/020808/08*

21 *<http://www.ddfint.org/modern-biopharmaceutics>*

22 *<https://editorial.edu.umb.es/2015/05/24/metodologias-biofarmaceuticas-en-el-desarrollo-de-medicamentos/>*

4.- Nuestras barreras futuras

El avance en las ciencias biofarmacéuticas se ha centrado hasta el momento en el desarrollo de modelos que reflejan el intestino humano adulto y sano y la barrera hematoencefálica sana. Este es el punto de partida para analizar las alteraciones que se producen en la membrana intestinal y cerebral en diversas patologías desde el Crohn hasta el Alzheimer. Las alteraciones patológicas de los volúmenes de fluidos intestinales y su composición, diferentes patrones de motilidad y cambios en la permeabilidad de la barrera son aún terreno por explorar y traducir a modelos *in vitro*. En el caso de la BBB también necesitamos indagar sobre las alteraciones en su composición, expresión de transportadores y resistencia difusional.

Otro aspecto de nuestro interés es el desarrollo de modelos *in vivo* e *in vitro* de grupos de población concretos como la población pediátrica. Las especiales características de la barrera intestinal y de la fisiología cambiante del tracto gastrointestinal durante el desarrollo requerirán, no uno, sino varios modelos que reflejen los distintos grupos de población infantil desde los recién nacidos, los neonatos a los lactantes, niños y adolescentes.

Estas diferencias hacen necesaria la redefinición del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica para cada uno de los grupos de edad. Es necesario definir los nuevos criterios de clasificación, ya que por ejemplo el volumen de 250 mL para la clasificación de solubilidad no corresponde con los volúmenes en el intestino infantil y a su vez necesitamos determinar los factores limitantes de la absorción en cada grupo pediátrico. Este aspecto es de gran importancia en formulación magistral extemporánea ya que para garantizar el comportamiento similar de distintas formulaciones sería deseable estandarizar aquellas cuyos principios activos estén limitados por la disolución. Nuestro grupo de investigación está trabajando ya en la definición de un nuevo BCS pediátrico.

Por otra parte, el paradigma del desarrollo farmacéutico está cambiando en los últimos años de la producción centrada en el “paciente promedio” al diseño centrado en grupos de pacientes concretos. La opinión de los pacien-

tes y cuidadores, que conocen de primera mano sus preferencias, necesidades, dificultades para la toma de la medicación y capacidad de cumplimiento, se toma cada vez más en cuenta por parte no sólo de la industria farmacéutica sino también de las agencias reguladoras²³.

Como ejemplo cabe mencionar que la administración de medicamentos orales se adapta en ocasiones a estas necesidades especiales con alternativas no contempladas durante el desarrollo clínico. Ante nuestra recomendación de que los medicamentos que se toman en ayunas se acompañen siempre con un vaso de agua, se nos planteó la dificultad de algunos pacientes geriátricos para la ingesta de líquidos. Muchos de ellos experimentan problemas de deglución que suelen paliarse con el uso de viscosizantes con la medicación triturada sin que apenas tengamos nociones de las posibles alteraciones que ello podría conllevar en la biodisponibilidad. Esta línea de investigación sugerida por la Dra. Marival Borrás-Bermejo es un ejemplo de diálogo entre investigadores farmacéuticos y médicos de atención primaria y de la necesaria y positiva colaboración entre los distintos profesionales de la salud. En este caso la aproximación desde el BCS puede guiar en la toma de decisiones para predecir cambios negativos en la absorción y diseñar estrategias que los eviten. A día de hoy estamos explorando la influencia de los viscosizantes habituales en la liberación y disolución de medicamentos frecuentes en pacientes geriátricos para establecer en función de la clase BCS del principio activo si estas alteraciones pueden o no tener consecuencias clínicas.

23 <https://www.fda.gov/drugs/development-approval-process-drugs/cder-patient-focused-drug-development>

5.- Conclusiones

La vía oral es la más usada y fisiológica y la mejor aceptada por los pacientes. Para la mayor parte de principios activos, sería deseable que fuera posible el desarrollo de formulaciones orales en particular en patologías crónicas. Ello requiere disponer en la etapa de descubrimiento y desarrollo de métodos experimentales capaces de predecir la capacidad de absorción intestinal de la molécula, sus mecanismos de transporte y su lugar de liberación óptimo. Adicionalmente, se deben caracterizar su solubilidad y velocidad de disolución desde la forma farmacéutica a fin de caracterizar los factores limitantes en su absorción gastrointestinal. Los modelos experimentales de estudios de perfusión en animales y los estudios *in vitro* en monocapas de células epiteliales han demostrado una capacidad predictiva adecuada para fármacos que se absorben por difusión pasiva. La determinación de la permeabilidad intestinal es uno de los parámetros necesarios para la clasificación de fármacos según el BCS y el establecimiento de aquellos casos en los que es factible la determinación de la bioequivalencia mediante ensayos de disolución *in vitro*.

Por otro lado, cuando existe un transportador implicado en la permeación, el adecuado modelado matemático del proceso de transporte permite maximizar la información obtenida a partir de resultados experimentales y escalar adecuadamente los parámetros de un modelo *in vitro* a la especie humana.

El desarrollo de modelos *in vitro* de la barrera intestinal ha servido de guía para desarrollar modelos celulares de otras barreras como la hematoencefálica que al tener condicionantes diferentes requieren modificaciones de las condiciones experimentales. Con el adecuado diseño experimental y tratamiento matemático es posible predecir *in vitro* los parámetros claves para el acceso al sistema nervioso central.

El uso del modelado matemático y la biosimulación es, asimismo, una herramienta útil en el diseño de ensayos clínicos como por ejemplo los ensayos de bioequivalencia en humanos a fin de garantizar sus posibilidades de éxito

cuando las formulaciones son realmente equivalentes (reducir riesgo beta e incrementar la potencia de la prueba) y asegurar la detección de formulaciones bioinequivalentes.

El mayor conocimiento de la fisiología gastrointestinal nos ha permitido identificar los factores relevantes para la absorción de medicamentos y plasmarlos en modelos de disolución intestinal *in vitro* que sirvan de herramientas de desarrollo de nuevas formulaciones farmacéuticas y que puedan disminuir e incluso remplazar los ensayos de bioequivalencia en voluntarios sanos.

Finalmente, la implementación en las normativas reguladoras del medicamento de criterios con sólidas bases científicas es un paso necesario para garantizar la accesibilidad de medicamentos de calidad contrastada con un uso óptimo de los recursos necesarios.

En resumen, la Biofarmacia y la Farmacocinética han llevado al principio activo de la píldora dorada, más allá de la barrera intestinal y han proporcionado herramientas para transformarla en multitud de alternativas tecnológicas que garantizan no solo un dulce sabor, como antaño, si no también el óptimo resultado terapéutico.

Bibliografía relevante.

Modelos biofísicos de absorción e influencia tensioactivos en la absorción intestinal¹⁻⁹

1. Garrigues, T. M.; Perezvarona, A. T.; Climent, E.; Bermejo, M.; Martin-Villodre, A.; Pla-Delfina, J. M. *Gastric Absorption of Acidic Xenobiotics in the Rat* - Biophysical Interpretation of an Apparently Atypical Behavior. *Int J Pharm* 1990, 64, (2-3), 11.
2. Bermejo, M.; Perezvarona, A. T.; Segura-Bono, M. J.; Martin-Villodre, A.; Pla-Delfina, J. M.; Garrigues, T. M. *Compared Effects of Synthetic and Natural Bile-Acid Surfactants on Xenobiotic Absorption* .1. Studies with Polysorbate and Taurocholate in Rat Colon. *Int J Pharm* 1991, 69, (3), 10.
3. Garrigues, T. M.; Perez-Varona, A. T.; Bermejo, M.; Martin-Villodre, A. *Absorption-Partition Relationships for True Homologous Series of Xenobiotics as a Possible Approach to Study Mechanisms of Surfactants in Absorption* .4. Phenylacetic Acid-Derivatives and Anionic Surfactants. *Int J Pharm* 1992, 79, ((2-3)), 5.
4. Garrigues, T. M.; Segura-Bono, M. J.; Bermejo, M.; Merino, V.; Pla-Delfina, J. M. *Compared Effects of Synthetic and Natural Bile-Acid Surfactant on Xenobiotic Absorption* .2. Studies with Sodium Glycocholate to Confirm a Hypothesis. *Int J Pharm* 1994, 101, (3), 209-217.
5. Segura-Bono, M. J.; Garrigues, T. M.; Merino, V.; Bermejo, M. *Compared Effects of Synthetic and Natural Bile-Acid Surfactants on Xenobiotic Absorption* .3. Studies with Mixed Micelles. *Int J Pharm* 1994, 107, (2), 159-166.
6. Merino, V.; Freixas, J.; Bermejo, M.; Garrigues, T. M.; Moreno, J.; Pla-Delfina, J. M. *Biophysical models as an approach to study passive absorption in drug development: 6-fluoroquinolones*. *J Pharm Sci* 1995, 84, (6), 777-782.
7. Bermejo, M.; Merino, V.; Garrigues, T. M.; Pla Delfina, J. M.; Mulet, A.; Vizet, P.; Trouiller, G.; Mercier, C. *Validation of a biophysical drug absorption model by the PATQSAR system*. *J Pharm Sci* 1999, 88, (4), 398-405.
8. Carmona-Ibanez, G.; del Val Bermejo-Sanz, M.; Rius-Alarco, F.; Martin-Villodre, A. *Experimental studies on the influence of surfactants on intestinal absorption of drugs. Cefadroxil as model drug and sodium taurocholate as natural model surfactant: studies in rat colon and in rat duodenum*. *Arzneimittelforschung* 1999, 49, (1), 44-50.
9. Ferrando, R.; Garrigues, T. M.; Bermejo, M. V.; Martin-Algarra, R.; Merino, V.; Polache, A. *Effects of ethanol on intestinal absorption of drugs: in situ studies with ciprofloxacin analogs in acute and chronic alcohol-fed rats*. *Alcohol Clin Exp Res* 1999, 23, (8), 1403-1408.

Modelado y predicción de la absorción oral¹⁰⁻³⁶

10. Ruiz-García, A.; Bermejo, M.; Merino, V.; Sanchez-Castano, G.; Freixas, J.; Garrigues, T. M. *Pharmacokinetics, bioavailability and absorption of flumequine in the rat*. *Eur J Pharm Biopharm* 1999, 48, (3), 253-258.
11. Sanchez-Castano, G.; Ruiz-García, A.; Banon, N.; Bermejo, M.; Merino, V.; Freixas, J.; Garrigues, T. M.; Pla-Delfina, J. M. *Intrinsic absolute bioavailability prediction in rats based on in situ absorption rate constants and/or in vitro partition coefficients: 6-fluoroquinolones*. *J Pharm Sci* 2000, 89, (11), 1395-1403.
12. Montalar, M.; Nalda-Molina, R.; Rodríguez-Ibanez, M.; García-Valcarcel, I.; Garrigues, T. M.; Merino, V.; Bermejo, M. *Kinetic modeling of triamterene intestinal absorption and its inhibition by folic acid and methotrexate*. *J Drug Target* 2003, 11, (4), 215-223.

13. Rodríguez-Ibanez, M.; Nalda-Molina, R.; Montalar-Montero, M.; Bermejo, M. V.; Merino, V.; Garrigues, T. M. *Transintestinal secretion of ciprofloxacin, grepafloxacin and sparfloxacin: in vitro and in situ inhibition studies*. Eur J Pharm Biopharm 2003, 55, (2), 241-246.
14. Bermejo, M.; Avdeef, A.; Ruiz, A.; Nalda, R.; Ruell, J. A.; Tsinman, O.; Gonzalez, I.; Fernandez, C.; Sanchez, G.; Garrigues, T. M.; Merino, V. *PAMPA--a drug absorption in vitro model 7. Comparing rat in situ, Caco-2, and PAMPA permeability of fluoroquinolones*. Eur J Pharm Sci 2004, 21, (4), 429-441.
15. Bermejo, M.; Gonzalez-Alvarez, I.; Fernandez-Teruel, C.; Ruiz-Garcia, A. *Absorption-lipophilicity correlation: Detection of an active transport mechanism*. European Journal of Pharmaceutical Sciences 2004, 23, (S), 72.
16. Fernandez-Teruel, C.; Gonzalez-Alvarez, I.; Casabo, V. G.; Ruiz-Garcia, A.; Bermejo, M. *Kinetic modelling of the intestinal transport of sarafloxacin. Studies in situ in rat and in vitro in Caco-2 cells*. J Drug Target 2005, 13, (3), 199-212.
17. Gonzalez-Alvarez, I.; Fernandez-Teruel, C.; Garrigues, T. M.; Casabo, V. G.; Ruiz-Garcia, A.; Bermejo, M. *Kinetic modelling of passive transport and active efflux of a fluoroquinolone across Caco-2 cells using a compartmental approach in NONMEM*. Xenobiotica 2005, 35, (12), 1067-1088.
18. Langguth, P.; Bermejo, M.; Lennernas, H. *Theme issue: Advances in understanding oral absorption and delivery of problem compounds - Selected Papers from the 3rd World Conference on Drug Absorption, Transport and Delivery - Preface*. European Journal of Pharmaceutical Sciences 2006, 29, (3-4), 1.
19. Rodríguez-Ibanez, M.; Sanchez-Castano, G.; Montalar-Montero, M.; Garrigues, T. M.; Bermejo, M.; Merino, V. *Mathematical modelling of in situ and in vitro efflux of ciprofloxacin and grepafloxacin*. Int J Pharm 2006, 307, (1), 33-41.
20. Balakrishnan, A.; Hussainzada, N.; Gonzalez, P.; Bermejo, M.; Swaan, P. W.; Polli, J. E. *Bias in estimation of transporter kinetic parameters from overexpression systems: Interplay of transporter expression level and substrate affinity*. J Pharmacol Exp Ther 2007, 320, (1), 133-144.
21. Gonzalez-Alvarez, I.; Fernandez-Teruel, C.; Casabo-Alos, V. G.; Garrigues, T. M.; Polli, J. E.; Ruiz-Garcia, A.; Bermejo, M. *In situ kinetic modelling of intestinal efflux in rats: functional characterization of segmental differences and correlation with in vitro results*. Biopharm Drug Dispos 2007, 28, (5), 229-239.
22. Lehotzky, A.; Tokesi, N.; Gonzalez-Alvarez, I.; Merino, V.; Bermejo, M.; Orosz, F.; Lau, P.; Kovacs, G. G.; Ovadi, J. *Progress in the development of early diagnosis and a drug with unique pharmacology to improve cancer therapy*. Philos Trans A Math Phys Eng Sci 2008, 366, (1880), 3599-3617.
23. Gonzalez-Alvarez, I.; Gonzalez-Alvarez, M.; Oltra-Noguera, D.; Merino, V.; Tokesi, N.; Ovadi, J.; Bermejo, M. *Unique pharmacology of KAR-2, a potential anti-cancer agent: absorption modelling and selective mitotic spindle targeting*. Eur J Pharm Sci 2009, 36, (1), 11-19.
24. Prieto, P.; Hoffmann, S.; Tirelli, V.; Tancredi, F.; Gonzalez, I.; Bermejo, M.; De Angelis, I. *An exploratory study of two Caco-2 cell models for oral absorption: a report on their within-laboratory and between-laboratory variability, and their predictive capacity*. Altern Lab Anim 2010, 38, (5), 367-386.
25. Fernandez-Teruel, C.; Mangas-Sanjuan, V.; Gonzalez-Alvarez, I.; Ruiz-Garcia, A.; Casabo, V. G.; Bermejo, M. *Mathematical modeling of oral absorption and bioavailability of a fluoroquinolone after its precipitation in the gastrointestinal tract*. Xenobiotica 2013, 43, (9), 745-754.
26. Mangas-Sanjuan, V.; Gonzalez-Alvarez, I.; Gonzalez-Alvarez, M.; Casabo, V. G.; Bermejo, M. *Modified non-sink equation for permeability estimation in cell monolayers: comparison with standard methods*. Mol Pharm 2014, 11, (5), 1403-1414.
27. Tugcu-Demiroz, F.; Gonzalez-Alvarez, I.; Gonzalez-Alvarez, M.; Bermejo, M. *Validation of phenol red versus gravimetric method for water reabsorption correction and study of gender differences in Doluisio's absorption technique*. Eur J Pharm Sci 2014, 62, 105-110.
28. Oltra-Noguera, D.; Mangas-Sanjuan, V.; Centelles-Sanguesa, A.; Gonzalez-Garcia, I.; Sanchez-Castano, G.; Gonzalez-Alvarez, M.; Casabo, V. G.; Merino, V.; Gonzalez-Alvarez, I.; Bermejo, M. *Variability of permeability estimation from different protocols of subculture and transport experiments in cell monolayers*. J Pharma-

col Toxicol Methods 2015, 71, 21-32.

29. Oltra-Noguera, D.; Mangas-Sanjuan, V.; Gonzalez-Alvarez, I.; Colon-Useche, S.; Gonzalez-Alvarez, M.; Bermejo, M. *Drug gastrointestinal absorption in rat: Strain and gender differences*. Eur J Pharm Sci 2015, 78, 198-203.
30. Lozoya-Agullo, I.; Zur, M.; Beig, A.; Fine, N.; Cohen, Y.; Gonzalez-Alvarez, M.; Merino-Sanjuan, M.; Gonzalez-Alvarez, I.; Bermejo, M.; Dahan, A. *Segmental-dependent permeability throughout the small intestine following oral drug administration: Single-pass vs. Doluisio approach to in-situ rat perfusion*. Int J Pharm 2016, 515, (1-2), 201-208.
31. Lozoya-Agullo, I.; Araujo, F.; Gonzalez-Alvarez, I.; Merino-Sanjuan, M.; Gonzalez-Alvarez, M.; Bermejo, M.; Sarmiento, B. *Usefulness of Caco-2/HT29-MTX and Caco-2/HT29-MTX/Raji B Coculture Models To Predict Intestinal and Colonic Permeability Compared to Caco-2 Monoculture*. Mol Pharm 2017, 14, (4), 1264-1270.
32. Lozoya-Agullo, I.; Gonzalez-Alvarez, I.; Zur, M.; Fine-Shamir, N.; Cohen, Y.; Markovic, M.; Garrigues, T. M.; Dahan, A.; Gonzalez-Alvarez, M.; Merino-Sanjuan, M.; Bermejo, M.; Avdeef, A. *Closed-Loop Doluisio (Colon, Small Intestine) and Single-Pass Intestinal Perfusion (Colon, Jejunum) in Rat-Biophysical Model and Predictions Based on Caco-2*. Pharm Res 2017, 35, (1), 2.
33. Lozoya-Agullo, I.; Zur, M.; Fine-Shamir, N.; Markovic, M.; Cohen, Y.; Porat, D.; Gonzalez-Alvarez, I.; Gonzalez-Alvarez, M.; Merino-Sanjuan, M.; Bermejo, M.; Dahan, A. *Investigating drug absorption from the colon: Single-pass vs. Doluisio approaches to in-situ rat large-intestinal perfusion*. Int J Pharm 2017, 527, (1-2), 135-141.
34. Ruiz-Picazo, A.; Lozoya-Agullo, I.; Ortiz-Azcarate, M.; Merino-Sanjuan, M.; Gonzalez-Alvarez, M.; Gonzalez-Alvarez, I.; Bermejo, M. *Comparison of segmental-dependent permeability in human and in situ perfusion model in rat*. Eur J Pharm Sci 2017, 107, 191-196.
35. Lozoya-Agullo, I.; Gonzalez-Alvarez, I.; Merino-Sanjuan, M.; Bermejo, M.; Gonzalez-Alvarez, M. *Preclinical models for colonic absorption, application to controlled release formulation development*. Eur J Pharm Biopharm 2018, 130, 247-259.
36. Vivancos, V.; Gonzalez-Alvarez, I.; Bermejo, M.; Gonzalez-Alvarez, M. *Giardiasis: characteristics, pathogenesis and new insights about treatment*. Curr Top Med Chem 2018.

Correlaciones estructura-absorción³⁷⁻⁴⁶

37. Cabrera Perez, M. A.; Gonzalez Diaz, H.; Fernandez Teruel, C.; Pla-Delfina, J. M.; Bermejo, M. *A novel approach to determining physicochemical and absorption properties of 6-fluoroquinolone derivatives: experimental assessment*. Eur J Pharm Biopharm 2002, 53, (3), 317-325.
38. Cabrera Perez, M. A.; Bermejo, M. *In silico prediction of central nervous system activity of compounds. Identification of potential pharmacophores by the TOPS-MODE approach*. Bioorg Med Chem 2004, 12, (22), 5833-5843.
39. Cabrera-Perez, M. A.; Bermejo, M.; Ramos-Torres, L.; Grau-Avalos, R.; Perez-Gonzalez, M.; Gonzalez-Diaz, H. *A topological sub-structural approach for predicting human intestinal absorption of drugs*. Eur J Med Chem 2004, 39, (11), 905-916.
40. Marrero Ponce, Y.; Cabrera Perez, M. A.; Romero Zaldivar, V.; Bermejo, M.; Mota, D.; Torrens, F. *Prediction of Intestinal Epithelial Transport of Drug in (Caco-2) Cell Culture from Molecular Structure using in silico Approaches During Early Drug Discovery*. Internet Electron. J. Mol. Des. 2005, 4.
41. Cabrera, M. A.; Gonzalez, I.; Fernandez, C.; Navarro, C.; Bermejo, M. *A topological substructural approach for the prediction of P-glycoprotein substrates*. J Pharm Sci 2006, 95, (3), 589-606.

42. Pham-The, H.; Gonzalez-Alvarez, I.; Bermejo, M.; Mangas-Sanjuan, V.; Centelles, I.; Garrigues, T.; Cabrera-Perez, M. A. *In Silico Prediction of Caco-2 Cell Permeability by a Classification QSAR Approach*. Molecular Informatics 2011, 30, (4), 376-385.
43. Cabrera-Perez, M. A.; Pham-The, H.; Bermejo, M.; Gonzalez-Alvarez, I.; Gonzalez-Alvarez, M.; Garrigues, T. M. *QSPR in oral bioavailability: specificity or integrality?* Mini Rev Med Chem 2012, 12, (6), 534-550.
44. Pham-The, H.; Garrigues, T.; Bermejo, M.; Gonzalez-Alvarez, I.; Monteagudo, M. C.; Cabrera-Perez, M. A. *Provisional classification and in silico study of biopharmaceutical system based on caco-2 cell permeability and dose number*. Mol Pharm 2013, 10, (6), 2445-2461.
45. Pham-The, H.; Gonzalez-Alvarez, I.; Bermejo, M.; Garrigues, T.; Le-Thi-Thu, H.; Cabrera-Perez, M. A. *The Use of Rule-Based and QSPR Approaches in ADME Profiling: A Case Study on Caco-2 Permeability*. Molecular Informatics 2013, 32, (5-6), 459-479.
46. Pham-The, H.; Casanola-Martin, G.; Garrigues, T.; Bermejo, M.; Gonzalez-Alvarez, I.; Nguyen-Hai, N.; Cabrera-Perez, M. A.; Le-Thi-Thu, H. *Exploring different strategies for imbalanced ADME data problem: case study on Caco-2 permeability modeling*. Mol Divers 2016, 20, (1), 93-109.

Estrategias de mejora de la absorción⁴⁷⁻⁶⁵

47. Gundogdu, E.; Gonzalez Alvarez, I.; Bermejo Sanz, M.; Karasulu, E. *Assessment of fexofenadine hydrochloride permeability and dissolution with an anionic surfactant using Caco-2 cells*. Pharmazie 2011, 66, (10), 747-753.
48. Gundogdu, E.; Mangas-Sanjuan, V.; Gonzalez-Alvarez, I.; Bermejo, M.; Karasulu, E. *In vitro-in situ permeability and dissolution of fexofenadine with kinetic modeling in the presence of sodium dodecyl sulfate*. Eur J Drug Metab Pharmacokinet 2012, 37, (1), 65-75.
49. Gonzalez-Alvarez, M.; Gonzalez-Alvarez, I.; Bermejo, M. *Hydrogels: an interesting strategy for smart drug delivery*. Ther Deliv 2013, 4, (2), 157-160.
50. Rodriguez-Berna, G.; Cabanas, M. J.; Mangas-Sanjuan, V.; Gonzalez-Alvarez, M.; Gonzalez-Alvarez, I.; Abasolo, I.; Schwartz, S., Jr.; Bermejo, M.; Corma, A. *Semisynthesis, cytotoxic activity, and oral availability of new lipophilic 9-substituted camptothecin derivatives*. ACS Med Chem Lett 2013, 4, (7), 651-655.
51. Samiei, N.; Mangas-Sanjuan, V.; Gonzalez-Alvarez, I.; Foroutan, M.; Shafaati, A.; Zarghi, A.; Bermejo, M. *Ion-pair strategy for enabling amifostine oral absorption: rat in situ and in vivo experiments*. Eur J Pharm Sci 2013, 49, (4), 499-504.
52. Rodriguez-Berna, G.; Mangas-Sanjuan, V.; Gonzalez-Alvarez, M.; Gonzalez-Alvarez, I.; Garcia-Gimenez, J. L.; Diaz Cabanas, M. J.; Bermejo, M.; Corma, A. *A promising camptothecin derivative: Semisynthesis, antitumor activity and intestinal permeability*. Eur J Med Chem 2014, 83, 366-373.
53. Borrás-Linares, I.; Herranz-Lopez, M.; Barrajon-Catalan, E.; Arraez-Roman, D.; Gonzalez-Alvarez, I.; Bermejo, M.; Gutierrez, A. F.; Micol, V.; Segura-Carretero, A. *Permeability Study of Polyphenols Derived from a Phenolic-Enriched Hibiscus sabdariffa Extract by UHPLC-ESI-UHR-Qq-TOF-MS*. Int J Mol Sci 2015, 16, (8), 18396-18411.
54. Frik, M.; Fernandez-Gallardo, J.; Gonzalo, O.; Mangas-Sanjuan, V.; Gonzalez-Alvarez, M.; Serrano Del Valle, A.; Hu, C.; Gonzalez-Alvarez, I.; Bermejo, M.; Marzo, I.; Contel, M. *Cyclometallated Iminophosphorane Gold(III) and Platinum(II) Complexes. A Highly Permeable Cationic Platinum(II) Compound with Promising Anticancer Properties*. J Med Chem 2015.
55. Mangas-Sanjuan, V.; Olah, J.; Gonzalez-Alvarez, I.; Lehotzky, A.; Tokesi, N.; Bermejo, M.; Ovadi, J. *Tubulin acetylation promoting potency and absorption efficacy of deacetylase inhibitors*. Br J Pharmacol 2015, 172, (3), 829-840.
56. Lozoya-Agullo, I.; Gonzalez-Alvarez, I.; Gonzalez-Alvarez, M.; Merino-Sanjuan, M.; Bermejo, M. *Develop-*

ment of an ion-pair to improve the colon permeability of a low permeability drug: Atenolol. Eur J Pharm Sci 2016, 93, 334-340.

57. Mangas-Sanjuan, V.; Gutierrez-Nieto, J.; Echezarreta-Lopez, M.; Gonzalez-Alvarez, I.; Gonzalez-Alvarez, M.; Casabo, V. G.; Bermejo, M.; Landin, M. *Intestinal Permeability of beta-Lapachone and Its Cyclodextrin Complexes and Physical Mixtures.* Eur J Drug Metab Pharmacokinet 2016, 41, (6), 795-806.
58. Bermejo, M.; Mangas-Sanjuan, V.; Gonzalez-Alvarez, I.; Gonzalez-Alvarez, M. *Enhancing Oral Absorption of beta-Lapachone: Progress Till Date.* Eur J Drug Metab Pharmacokinet 2017, 42, (1), 1-10.
59. Gonzalez-Alvarez, M.; Coll, C.; Gonzalez-Alvarez, I.; Gimenez, C.; Aznar, E.; Martinez-Bisbal, M. C.; Lozoya-Agullo, I.; Bermejo, M.; Martinez-Manez, R.; Sancenon, F. *Gated Mesoporous Silica Nanocarriers for a "Two-Step" Targeted System to Colonic Tissue.* Mol Pharm 2017, 14, (12), 4442-4453.
60. Lozoya-Agullo, I.; Araujo, F.; Gonzalez-Alvarez, I.; Merino-Sanjuan, M.; Gonzalez-Alvarez, M.; Bermejo, M.; Sarmiento, B. *PLGA nanoparticles are effective to control the colonic release and absorption on ibuprofen.* Eur J Pharm Sci 2017, 115, 119-125.
61. Perez-Sanchez, A.; Borrás-Linares, I.; Barrajón-Catalán, E.; Arraez-Roman, D.; Gonzalez-Alvarez, I.; Ibanez, E.; Segura-Carretero, A.; Bermejo, M.; Micol, V. *Evaluation of the intestinal permeability of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) extract polyphenols and terpenoids in Caco-2 cell monolayers.* PLoS One 2017, 12, (2), e0172063.
62. Martínez-Martínez, M.; Rodríguez-Berna, G.; Gonzalez-Alvarez, I.; Hernandez, M. J.; Corma, A.; Bermejo, M.; Merino, V.; Gonzalez-Alvarez, M. *Ionic Hydrogel Based on Chitosan Cross-Linked with 6-Phosphogluconic Trisodium Salt as a Drug Delivery System.* Biomacromolecules 2018, 19, (4), 1294-1304.
63. Lozoya-Agullo, I.; Planelles, M.; Merino-Sanjuan, M.; Bermejo, M.; Sarmiento, B.; Gonzalez-Alvarez, I.; Gonzalez-Alvarez, M. *Ion-pair approach coupled with nanoparticle formation to increase bioavailability of a low permeability charged drug.* Int J Pharm 2019, 557, 36-42.
64. Martínez-Martínez, M.; Rodríguez-Berna, G.; Bermejo, M.; Gonzalez-Alvarez, I.; Gonzalez-Alvarez, M.; Merino, V. *Covalently crosslinked organophosphorous derivatives-chitosan hydrogel as a drug delivery system for oral administration of camptothecin.* Eur J Pharm Biopharm 2019, 136, 174-183.
65. Perez-Sanchez, A.; Cuyas, E.; Ruiz-Torres, V.; Agullo-Chazarra, L.; Verdura, S.; Gonzalez-Alvarez, I.; Bermejo, M.; Joven, J.; Micol, V.; Bosch-Barrera, J.; Menendez, J. A. *Intestinal Permeability Study of Clinically Relevant Formulations of Silibinin in Caco-2 Cell Monolayers.* Int J Mol Sci 2019, 20, (7).

Clasificación Biofarmacéutica⁶⁶⁻⁷⁴

66. Kasim, N. A.; Whitehouse, M.; Ramachandran, C.; Bermejo, M.; Lennernas, H.; Hussain, A. S.; Junginger, H. E.; Stavchansky, S. A.; Midha, K. K.; Shah, V. P.; Amidon, G. L. *Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification.* Mol Pharm 2004, 1, (1), 85-96.
67. Takagi, T.; Ramachandran, C.; Bermejo, M.; Yamashita, S.; Yu, L. X.; Amidon, G. L. *A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan.* Mol Pharm 2006, 3, (6), 631-643.
68. Arnal, J.; Gonzalez-Alvarez, I.; Bermejo, M.; Amidon, G. L.; Junginger, H. E.; Kopp, S.; Midha, K. K.; Shah, V. P.; Stavchansky, S.; Dressman, J. B.; Barends, D. M. *Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: aciclovir.* J Pharm Sci 2008, 97, (12), 5061-5073.
69. Dahan, A.; Wolk, O.; Kim, Y. H.; Ramachandran, C.; Crippen, G. M.; Takagi, T.; Bermejo, M.; Amidon, G. L. *Purely in silico BCS classification: science based quality standards for the world's drugs.* Mol Pharm 2013, 10, (11), 4378-4390.

70. Gonzalez-Alvarez, I.; Cabrera-Perez, M. A.; Bermejo, M. *Metodologías Biofarmacéuticas en el Desarrollo de Medicamentos*. Editorial electrónica UMH. Plataforma Google Play. 2015.
71. Lozoya-Agullo, I.; Zur, M.; Wolk, O.; Beig, A.; Gonzalez-Alvarez, I.; Gonzalez-Alvarez, M.; Merino-Sanjuan, M.; Bermejo, M.; Dahan, A. *In-situ intestinal rat perfusions for human Fabs prediction and BCS permeability class determination: Investigation of the single-pass vs. the Doluisio experimental approaches*. Int J Pharm 2015, 480, (1-2), 1-7.
72. Caldeira, T. G.; Ruiz-Picazo, A.; Lozoya-Agullo, I.; Saude-Guimaraes, D. A.; Gonzalez-Alvarez, M.; de Souza, J.; Gonzalez-Alvarez, I.; Bermejo, M. *Determination of intestinal permeability using in situ perfusion model in rats: Challenges and advantages to BCS classification applied to digoxin*. Int J Pharm 2018, 551, (1-2), 148-157.
73. Del Moral Sanchez, J. M.; Gonzalez-Alvarez, I.; Cerda-Revert, A.; Gonzalez-Alvarez, M.; Navarro-Ruiz, A.; Amidon, G. L.; Bermejo, M. *Biopharmaceutical optimization in neglected diseases for paediatric patients by applying the provisional paediatric biopharmaceutical classification system*. Br J Clin Pharmacol 2018, 84, (10), 2231-2241.
74. delMoral-Sanchez, J. M.; Ruiz-Picazo, A.; Gonzalez-Alvarez, M.; Navarro, A.; Gonzalez-Alvarez, I.; Bermejo, M. *Impact on intestinal permeability of pediatric hyperosmolar formulations after dilution: Studies with rat perfusion method*. Int J Pharm 2019, 557, 154-161.

Modelado farmacocinético y simulación ensayos de bioequivalencia⁷⁵⁻⁸⁵

75. Ruiz-Garcia, A.; Bermejo, M.; Moss, A.; Casabo, V. G. *Pharmacokinetics in drug discovery*. J Pharm Sci 2008, 97, (2), 654-690.
76. Fernandez-Teruel, C.; Gonzalez-Alvarez, I.; Navarro-Fontestad, C.; Garcia-Arieta, A.; Bermejo, M.; Casabo, V. G. *Computer simulations of bioequivalence trials: selection of design and analyte in BCS drugs with first-pass hepatic metabolism: Part II. Non-linear kinetics*. Eur J Pharm Sci 2009, 36, (1), 147-156.
77. Fernandez-Teruel, C.; Nalda Molina, R.; Gonzalez-Alvarez, I.; Navarro-Fontestad, C.; Garcia-Arieta, A.; Casabo, V. G.; Bermejo, M. *Computer simulations of bioequivalence trials: selection of design and analyte in BCS drugs with first-pass hepatic metabolism: linear kinetics (I)*. Eur J Pharm Sci 2009, 36, (1), 137-146.
78. Navarro-Fontestad, C.; Gonzalez-Alvarez, I.; Fernandez-Teruel, C.; Garcia-Arieta, A.; Bermejo, M.; Casabo, V. G. *Computer simulations for bioequivalence trials: selection of analyte in BCS drugs with first-pass metabolism and two metabolic pathways*. Eur J Pharm Sci 2010, 41, (5), 716-728.
79. Navarro-Fontestad, C.; Gonzalez-Alvarez, I.; Fernandez-Teruel, C.; Bermejo, M.; Casabo, V. G. *A new mathematical approach for the estimation of the AUC and its variability under different experimental designs in preclinical studies*. Pharm Stat 2012, 11, (1), 14-23.
80. Cuesta-Gragera, A.; Navarro-Fontestad, C.; Mangas-Sanjuan, V.; Gonzalez-Alvarez, I.; Garcia-Arieta, A.; Troconiz, I. F.; Casabo, V. G.; Bermejo, M. *Validation of a semi-physiological model for caffeine in healthy subjects and cirrhotic patients*. Eur J Pharm Sci 2015, 73, 57-63.
81. Cuesta-Gragera, A.; Navarro-Fontestad, C.; Mangas-Sanjuan, V.; Gonzalez-Alvarez, I.; Garcia-Arieta, A.; Troconiz, I. F.; Casabo, V. G.; Bermejo, M. *Semi-physiologic model validation and bioequivalence trials simulation to select the best analyte for acetylsalicylic acid*. Eur J Pharm Sci 2015.
82. Perez-Castello, I.; Mangas-Sanjuan, V.; Gonzalez-Garcia, I.; Gonzalez-Alvarez, I.; Bermejo, M.; Marco-Garbayo, J. L.; Troconiz, I. F. *Population pharmacokinetic model of lithium and drug compliance assessment*. Eur Neuropsychopharmacol 2016, 26, (12), 1868-1876.
83. Mangas-Sanjuan, V.; Navarro-Fontestad, C.; Garcia-Arieta, A.; Troconiz, I. F.; Bermejo, M. *Computer simulations for bioequivalence trials: Selection of analyte in BCS class II and IV drugs with first-pass metabolism, two metabolic pathways and intestinal efflux transporter*. Eur J Pharm Sci 2018, 117, 193-203.

84. Paixao, P.; Bermejo, M.; Hens, B.; Tsume, Y.; Dickens, J.; Shedden, K.; Salehi, N.; Koenigsnecht, M. J.; Baker, J. R.; Hasler, W. L.; Lionberger, R.; Fan, J.; Wysocki, J.; Wen, B.; Lee, A.; Frances, A.; Amidon, G. E.; Yu, A.; Benninghoff, G.; Lobenberg, R.; Talatoff, A.; Sun, D.; Amidon, G. L. *Gastric emptying and intestinal appearance of nonabsorbable drugs phenol red and paromomycin in human subjects: A multi-compartment stomach approach*. Eur J Pharm Biopharm 2018, 129, 162-174.
85. Reynaldo-Fernandez, G.; Solozabal, J.; Amaro, D.; Fernandez-Sanchez, E. M.; Rodriguez-Vera, L.; Bermejo, M.; Mangas-Sanjuan, V.; Troconiz, I. F. *Semi-mechanistic Pharmacokinetic/Pharmacodynamic model of three pegylated rHuEPO and ior(R)EPOCIM in New Zealand rabbits*. Eur J Pharm Sci 2018, 120, 123-132.

Modelos de disolución predictiva In vivo⁸⁶⁻¹⁰¹

86. Colon-Useche, S.; Gonzalez-Alvarez, I.; Mangas-Sanjuan, V.; Gonzalez-Alvarez, M.; Pastoriza, P.; Molina-Martinez, I.; Bermejo, M.; Garcia-Arieta, A. *Investigating the Discriminatory Power of BCS-Bio waiver In Vitro Methodology to Detect Bioavailability Differences between Immediate Release Products Containing a Class I Drug*. Mol Pharm 2015.
87. Gonzalez-Garcia, I.; Mangas-Sanjuan, V.; Merino-Sanjuan, M.; Bermejo, M. *In vitro-in vivo correlations: general concepts, methodologies and regulatory applications*. Drug Dev Ind Pharm 2015, 41, (12), 1935-1947.
88. Gonzalez-Garcia, I.; Mangas-Sanjuan, V.; Merino-Sanjuan, M.; Alvarez-Alvarez, C.; Diaz-Garzon Marco, J.; Rodriguez-Bonnin, M. A.; Langguth, T.; Torrado-Duran, J. J.; Langguth, P.; Garcia-Arieta, A.; Bermejo, M. *IVIVC approach based on carbamazepine bioequivalence studies combination*. Pharmazie 2017, 72, (8), 449-455.
89. Hens, B.; Tsume, Y.; Bermejo, M.; Paixao, P.; Koenigsnecht, M. J.; Baker, J. R.; Hasler, W. L.; Lionberger, R.; Fan, J.; Dickens, J.; Shedden, K.; Wen, B.; Wysocki, J.; Loebenberg, R.; Lee, A.; Frances, A.; Amidon, G.; Yu, A.; Benninghoff, G.; Salehi, N.; Talatoff, A.; Sun, D.; Amidon, G. L. *Low Buffer Capacity and Alternating Motility along the Human Gastrointestinal Tract: Implications for in Vivo Dissolution and Absorption of Ionizable Drugs*. Mol Pharm 2017, 14, (12), 4281-4294.
90. Al-Gousous, J.; Sun, K. X.; McNamara, D. P.; Hens, B.; Salehi, N.; Langguth, P.; Bermejo, M.; Amidon, G. E.; Amidon, G. L. *Mass Transport Analysis of the Enhanced Buffer Capacity of the Bicarbonate-CO2 Buffer in a Phase-Heterogenous System: Physiological and Pharmaceutical Significance*. Mol Pharm 2018, 15, (11), 5291-5301.
91. Bermejo, M.; Paixao, P.; Hens, B.; Tsume, Y.; Koenigsnecht, M. J.; Baker, J. R.; Hasler, W. L.; Lionberger, R.; Fan, J.; Dickens, J.; Shedden, K.; Wen, B.; Wysocki, J.; Lobenberg, R.; Lee, A.; Frances, A.; Amidon, G. E.; Yu, A.; Salehi, N.; Talatoff, A.; Benninghoff, G.; Sun, D.; Kuminek, G.; Cavanagh, K. L.; Rodriguez-Hornedo, N.; Amidon, G. L. *Linking the Gastrointestinal Behavior of Ibuprofen with the Systemic Exposure between and within Humans-Part 1: Fasted State Conditions*. Mol Pharm 2018, 15, (12), 5454-5467.
92. Gonzalez-Garcia, I.; Garcia-Arieta, A.; Merino-Sanjuan, M.; Mangas-Sanjuan, V.; Bermejo, M. *Defining level A IVIVC dissolution specifications based on individual in vitro dissolution profiles of a controlled release formulation*. Eur J Pharm Sci 2018, 119, 200-207.
93. Hens, B.; Al-Gousous, J.; Wang, K.; Salehi, N.; Ziff, R. M.; Tsume, Y.; Bermejo, M.; Paixão, P.; Brasseur, J.; Yu, A.; Talatoff, A.; Benninghoff, G.; Langguth, P.; Lennernäs, H.; Hasler, W. L.; Marciani, L.; Sun, D.; Amidon, G. E.; Dickens, J.; Shedden, K.; Löbenberg, R.; Amidon, G. L. *Summary of the In Vivo Predictive Dissolution (iPD)–Oral Drug Delivery (ODD) Dissolution Technologies 2018*, 50-52.
94. Hens, B.; Bermejo, M.; Tsume, Y.; Gonzalez-Alvarez, I.; Ruan, H.; Matsui, K.; Amidon, G. E.; Cavanagh, K. L.; Kuminek, G.; Benninghoff, G.; Fan, J.; Rodriguez-Hornedo, N.; Amidon, G. L. *Evaluation and optimized selection of saturating drug delivery systems of posaconazole (BCS class 2b) in the gastrointestinal simulator (GIS): An in vitro-in silico-in vivo approach*. Eur J Pharm Sci 2018, 115, 258-269.
95. Hens, B.; Sinko, P. D.; Job, N.; Dean, M.; Al-Gousous, J.; Salehi, N.; Ziff, R. M.; Tsume, Y.; Bermejo, M.; Paixao, P.; Brasseur, J. G.; Yu, A.; Talatoff, A.; Benninghoff, G.; Langguth, P.; Lennernas, H.; Hasler, W. L.;

- Marciani, L.; Dickens, J.; Shedden, K.; Sun, D.; Amidon, G. E.; Amidon, G. L. *Formulation predictive dissolution (fPD) testing to advance oral drug product development: An introduction to the US FDA funded '21st Century BA/BE' project*. Int J Pharm 2018, 548, (1), 120-127.
96. Hens, B.; Talattof, A.; Paixao, P.; Bermejo, M.; Tsume, Y.; Lobenberg, R.; Amidon, G. L. *Measuring the Impact of Gastrointestinal Variables on the Systemic Outcome of Two Suspensions of Posaconazole by a PBPK Model*. Aaps J 2018, 20, (3), 57.
97. Paixao, P.; Bermejo, M.; Hens, B.; Tsume, Y.; Dickens, J.; Shedden, K.; Salehi, N.; Koenigsnecht, M. J.; Baker, J. R.; Hasler, W. L.; Lionberger, R.; Fan, J.; Wysocki, J.; Wen, B.; Lee, A.; Frances, A.; Amidon, G. E.; Yu, A.; Benninghoff, G.; Lobenberg, R.; Talattof, A.; Sun, D.; Amidon, G. L. *Linking the Gastrointestinal Behavior of Ibuprofen with the Systemic Exposure between and within Humans-Part 2: Fed State*. Mol Pharm 2018, 15, (12), 5468-5478.
98. Ruiz Picazo, A.; Martínez-Martínez, M. T.; Colon-Useche, S.; Iriarte, R.; Sanchez-Dengra, B.; Gonzalez-Alvarez, M.; Garcia-Arieta, A.; Gonzalez-Alvarez, I.; Bermejo, M. *In Vitro Dissolution as a Tool for Formulation Selection: Telmisartan Two-Step IVIVC*. Mol Pharm 2018, 15, (6), 2307-2315.
99. Tsume, Y.; Patel, S.; Fotaki, N.; Bergstrm, C.; Amidon, G. L.; Brasseur, J. G.; Mudie, D. M.; Sun, D.; Bermejo, M.; Gao, P.; Zhu, W.; Sperry, D. C.; Vertzoni, M.; Parrott, N.; Lionberger, R.; Kambayashi, A.; Hermans, A.; Lu, X.; Amidon, G. E. *In Vivo Predictive Dissolution and Simulation Workshop Report: Facilitating the Development of Oral Drug Formulation and the Prediction of Oral Bioperformance*. Aaps J 2018, 20, (6), 100.
100. Al-Gousous, J.; Ruan, H.; Blechar, J. A.; Sun, K. X.; Salehi, N.; Langguth, P.; Job, N. M.; Lipka, E.; Loebenberg, R.; Bermejo, M.; Amidon, G. E.; Amidon, G. L. *Mechanistic analysis and experimental verification of bicarbonate-controlled enteric coat dissolution: Potential in vivo implications*. Eur J Pharm Biopharm 2019, 139, 47-58.
101. Bermejo, M.; Kuminek, G.; Al-Gousous, J.; Ruiz-Picazo, A.; Tsume, Y.; Garcia-Arieta, A.; Gonzalez-Alvarez, I.; Hens, B.; Amidon, G. E.; Rodriguez-Hornedo, N.; Amidon, G. L.; Mudie, D. *Exploring Bioequivalence of Dexketoprofen Trometamol Drug Products with the Gastrointestinal Simulator (GIS) and Precipitation Pathways Analyses*. Pharmaceutics 2019, 11, (3).

Barrera Hematoencefálica¹⁰²⁻¹⁰⁶

102. Cabrera, M. A.; Bermejo, M.; Perez, M.; Ramos, R. *TOPS-MODE approach for the prediction of blood-brain barrier permeation*. J Pharm Sci 2004, 93, (7), 1701-1717.
103. Mangas-Sanjuan, V.; Gonzalez-Alvarez, M.; Gonzalez-Alvarez, I.; Bermejo, M. *Drug penetration across the blood-brain barrier: an overview*. Ther Deliv 2010, 1, (4), 535-562.
104. Navarro, C.; Gonzalez-Alvarez, I.; Gonzalez-Alvarez, M.; Manku, M.; Merino, V.; Casabo, V. G.; Bermejo, M. *Influence of polyunsaturated fatty acids on Cortisol transport through MDCK and MDCK-MDR1 cells as blood-brain barrier in vitro model*. Eur J Pharm Sci 2011, 42, (3), 290-299.
105. Mangas-Sanjuan, V.; Gonzalez-Alvarez, I.; Gonzalez-Alvarez, M.; Casabo, V. G.; Bermejo, M. *Innovative in vitro method to predict rate and extent of drug delivery to the brain across the blood-brain barrier*. Mol Pharm 2013, 10, (10), 3822-3831.
106. Di Meo, C.; Martínez-Martínez, M.; Coviello, T.; Bermejo, M.; Merino, V.; Gonzalez-Alvarez, I.; Gonzalez-Alvarez, M.; Matricardi, P. *Long-Circulating Hyaluronan-Based Nanohydrogels as Carriers of Hydrophobic Drugs*. Pharmaceutics 2018, 10, (4).



**Colegio Oficial
de Farmacéuticos
de la Provincia
de Alicante**

MICOF

MUY ILUSTRE COLEGIO OFICIAL
DE FARMACÉUTICOS DE VALENCIA

**ICOF
CS**



**IL·LUSTRE
Col·legi Oficial
de FARMACÈUTICS
de CASTELLÓ**