UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
FACOLTÀ DI FARMACIA

Quality by Design

Case study:

OTTIMIZZAZIONE STATISTICA DI UNA FORMULAZIONE DI *PELLETS* DISGREGANTI PER LA SOMMINISTRAZIONE ORALE DI NANOPARTICELLE VEICOLANTI INSULINA

Luca Palugan

DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACEUTICHE
Sezione di Tecnologia e Legislazione Farmaceutica ME Sangalli

DIABETE MELLITO e TERAPIA

Gruppo di patologie metaboliche legate a difetti della secrezione di insulina, della sua azione o di entrambi.

Dal 2001 al 2010 aumento del numero di pazienti da 170 a 285 milioni.

Previsione di raggiungere i 439 milioni di malati nel 2030.

Mortalità associata a complicanze a lungo termine

INSULINA: terapia sostitutiva nel diabete di tipo I e unico intervento terapeutico ad oggi possibile per il trattamento degli stadi avanzati di diabete di tipo II.

efficace ma ridotta compliance

Somministrazione: via sottocutanea

SOMMINISTRAZIONE PER VIE ALTERNATIVE

Via inalatoria

Via ORALE Vantaggi: maggiore compliance

minor costo

distribuzione più simile a quella fisiologica

Svantaggi: degradazione chimica ed enzimatica

scarso assorbimento dei peptidi

SCARSA BIODISPONIBILITA'

SOMMINISTRAZIONE PER VIE ALTERNATIVE

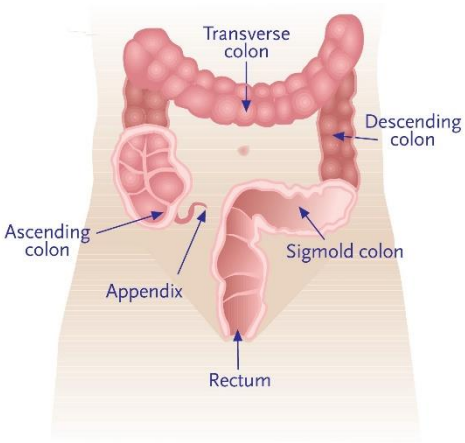
Via ORALE → **SCARSA BIODISPONIBILITA'**

Strategie per la somministrazione orale:

- *absorption enhancers* → PEI, NaGly
- inibitori enzimatici → NaGly
- modificazioni chimiche dell'insulina
- veicolazione in nanoparticelle → NPs polimeriche
- sistemi di rilascio al colon → *Pellets* rivestiti
- sistemi mucoadesivi → PEI

FORME FARMACEUTICHE AD UNITA' MULTIPLA PER IL RILASCIO AL COLON: I *PELLETS*

Razionali rilascio al colon



- elevato tempo di residenza
- ridotta quantità di peptidasi

Razionali *pellets*

- buona riproducibilità tempo di transito gastrointestinale
- buona riproducibilità profili di assorbimento farmaco
- elevata capacità di caricamento
- superficie liscia
- forma sferica/pseudosferica
- buona resistenza meccanica

TECNICHE PER LA PREPARAZIONE DI *PELLETS*

INGROSSAMENTO *(size-enlargement)*

- **Agglomerazione**
  - **AGITAZIONE**
    - Pallottizzazione *(rolling/tumbling equipments*
    - Rotogranulazione *(centrifugal equipments)*
  - **COMPATTAZIONE**
    - Compressione
    - **Estrusione/ Sferonizzazione**
- **Stratificazione su nuclei preformati** *Layering con:*
  - soluzioni
  - sospensioni
  - fusi
  - polveri
- **Globulazione**
  - spray-drying
  - spray-congealing

Lotti di piccolo entità
NPs in sospensione

Formulazione:

7,0 g NPs (sospensione 10% p:p)
7,0 g Avicel CL611
2,2 g sodio glicocolato

Preparazione per estrusione/sferonizzazione

Messa a punto del metodo con formulazioni placebo con Avicel CL611 (50%, p:p) e diversi tipi di sostanze

Preparazione di pellets con NPs

Preparazione per estrusione/sferonizzazione

Formulazione:

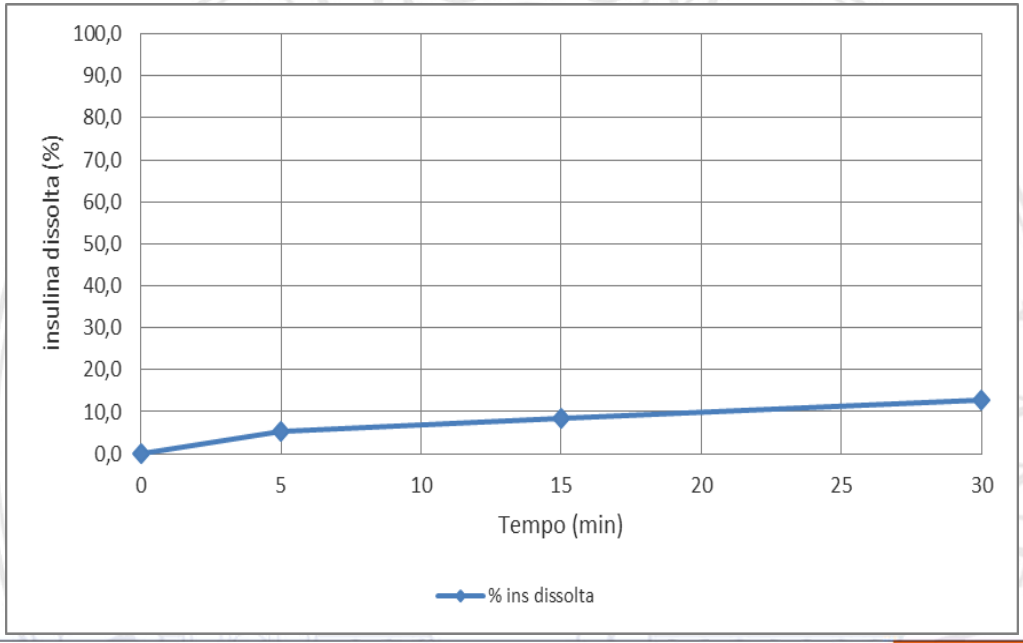
7,0 g NPs (sospensione)
7,0 g Avicel CL611
2,2 g sodio glicocolato

Caratterizzazione:

- resa di processo
- analisi granulometrica
- morfologia
- performance biofarmaceutiche

	Lt NPs placebo	Lt NPs ins
Resa di processo (%)	60,3	47,1
Resa 710-1400 µm (%)	92,2	69,5
d_{geo} (µm)	908	723
σ_{geo}	1,21	1,42
10% *interval fraction*	48,89	44,19
Circularity	0,70	0,84
Roundness	0,75	0,84
Aspect ratio	1,36	1,21
% disgregazione	10,8	/
$\%_{5minuti}$	/	5,27

Lt NPs ins



SCOPO

Ricerca e sviluppo di una nuova formulazione adatta alla produzione di *pellets* caratterizzati da una migliore attitudine alla **disgregazione** per facilitare il **passaggio in soluzione** dell'attivo.

FORMULAZIONE

Agente tracciante	→	Paracetamolo
Agente sferonizzante	→	-Avicel CL611 -Vivapur MCG811
Diluente solubile	→	Lattosio
Agente disgregante	→	-Ac-Di-Sol -Explotab CLV -Kollidon CL

Studio statistico tramite

DISEGNO SPERIMENTALE

Stadi del processo sperimentale (DoE)

1. Definizione degli **obiettivi**
2. Scelta dei **fattori** (variabili indipendenti) da investigare e dei loro valori operativi o **livelli** (spazio sperimentale - audaci ma non folli!!), dove varrà il modello matematico.
3. Selezione della/e **risposta/e** (variabile/i dipendente/i) adatta/e sulla base dell'obiettivo.
4. Scelta del **disegno sperimentale**: compromesso tra il desiderato grado di accuratezza del modello che descrive la risposta e lo sforzo sperimentale sostenibile.
5. Esecuzione delle **prove sperimentali** previste e **raccolta dei dati**.
6. **Analisi dei dati** applicando i metodi definiti precedentemente (calcolo del/i modello/i matematico/i e sua/loro validazione).
7. **Conclusioni** sui risultati.
8. **Ottimizzazione** del processo e/o del prodotto.

I fattori non considerati nel disegno, ma che possono influenzare il valore dei risultati, sono mantenuti costanti a livelli prefissati.

Esecuzione di prove preliminari per la selezione delle variabili indipendenti e dei loro livelli.

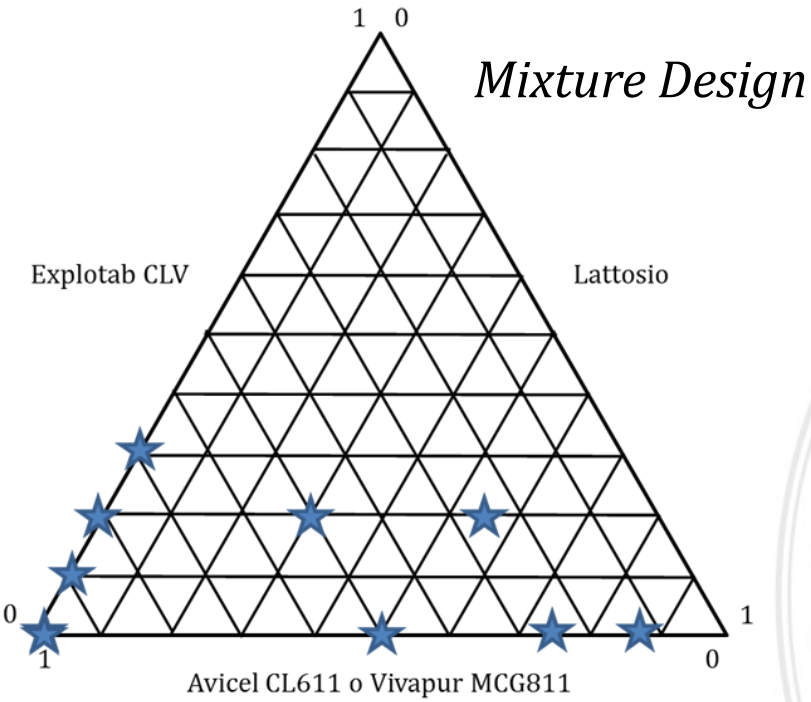
Selezione fattori e loro livelli

- agente sferonizzante (12,5 – 100%)
- Lattosio (0 – 87,5%)
- Explotab CLV (0 – 30%)

Selezione risposte

- resa di processo
- d_{geo}
- σ_{geo}
- 10% *interval fraction*
- *circularity*
- *roundness*
- *aspect ratio*
- % disgregazione
- $\%_{5minuti}$

Scelta del disegno sperimentale



9 prove sperimentali

Prove eseguite sostituendo NPs veicolanti insulina con un adeguato tracciante, paracetamolo (50% p:p).

L'impiego del tracciante in polvere o in sospensione ha dimostrato non modificare i risulttai.

N° prova	N° lotto	Avicel CL611	Explotab CLV	Lattosio	Quantità acqua (g)
		Proporzione dello spazio formulativo destinato agli eccipienti			
1	A-CL100	1	0	0	10,2
2	A-CL50L50	0,5	0	0,5	7,1
3	A-CL25L75	0,25	0	0,75	4,9
4	A-CL12,5L87,5	0,125	0	0,875	4,1
5	A-CL80E20	0,8	0,2	0	9,3
6	A-CL90E10	0,9	0,1	0	11,0
7	A-CL70E30	0,7	0,3	0	11,4
8	A-CL25E20L55	0,25	0,2	0,55	11,0
9	A-CL50E20L30	0,5	0,2	0,3	11,4

MATRICI DEI DISEGNI SPERIMENTALI e quantità di liquido legante utilizzata.

N° prova	N° lotto	Vivapur MCG811	Explotab CLV	Lattosio	Quantità acqua (g)
		Proporzione dello spazio formulativo destinato agli eccipienti			
10	A-MCG100	1	0	0	11,6
11	A-MCG50L50	0,5	0	0,5	7,0
12	A-MCG25L75	0,25	0	0,75	4,7
13	A-MCG12,5L87,5	0,125	0	0,875	4,1
14	A-MCG80E20	0,8	0,2	0	12,5
15	A-MCG90E10	0,9	0,1	0	11,0
16	A-MCG70E30	0,7	0,3	0	10,8
17	A-MCG25E20L55	0,25	0,2	0,55	11,0
18	A-MCG50E20L30	0,5	0,2	0,3	10,8

RISULTATI

Pellets con Avicel CL611

	N° prova								
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
Resa di processo (%)	74,5	76,6	80,9	52,1	56,4	70,7	63,6	57,4	63,6
d_{geo} (µm)	1017	1381	1301	919	858	1031	849	796	823
σ_{geo}	1,27	1,14	1,17	1,29	1,25	1,16	1,36	1,47	1,42
10% *interval fraction*	66,6	26,1	52,6	31,8	58,1	68,5	38,8	39,2	41,6
Circularity	0,79	0,86	0,88	0,82	0,75	0,82	0,79	0,80	0,77
Roundness	0,80	0,93	0,94	0,81	0,75	0,83	0,79	0,78	0,79
Aspect ratio	1,27	1,07	1,07	1,23	1,36	1,22	1,33	1,30	1,28
% disgregazione	9,1	76,8	87,5	92,9	73,5	61,8	83,0	99,3	87,5
$\%_{5minuti}$	38,8	42,0	42,5	43,3	94,7	54,4	99,1	99,7	99,4

Pellets con Vivapur MCG811

	N° prova								
	10	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**
Resa di processo (%)	78,6	82,3	77,9	70,3	67,1	76,6	50,0	57,1	66,4
d_{geo} (µm)	1130	1272	1202	1173	971	1055	808	840	890
σ_{geo}	1,13	1,17	1,14	1,20	1,26	1,16	1,31	1,41	1,36
10% *interval fraction*	61,3	61,0	58,2	46,0	49,0	78,9	48,5	42,2	44,7
Circularity	0,83	0,87	0,87	0,89	0,78	0,83	0,78	0,78	0,83
Roundness	0,85	0,92	0,93	0,94	0,76	0,82	0,78	0,77	0,83
Aspect ratio	1,18	1,09	1,08	1,07	1,32	1,22	1,29	1,32	1,22
% disgregazione	43,9	73,6	86,1	91,5	63,5	53,4	80,0	99,3	93,4
$\%_{5minuti}$	38,0	39,6	40,1	37,1	82,0	50,9	97,9	98,6	96,7

$$Y = b_A X_A + b_B X_B + b_C X_C + b_{AB} X_A X_B + b_{AC} X_A X_C + b_{BC} X_B X_C$$

Relazione descrittiva l'andamento delle singole variabili dipendenti in funzione dei valori assunti dalle variabili indipendenti.

-**Y** = risposta (variabile dipendente);

-$\mathbf{b_A}$, $\mathbf{b_B}$, $\mathbf{b_c}$ = coefficienti di regressione delle variabili A, B, C rispettivamente;

-$\mathbf{b_{AB}}$, $\mathbf{b_{AC}}$, $\mathbf{b_{BC}}$ = coefficienti di regressione delle interazioni tra le variabili A e B, A e C, B e C rispettivamente;

-$\mathbf{X_A}$, $\mathbf{X_B}$, $\mathbf{X_C}$ = livelli dei fattori A, B e C (variabili indipendenti)

Con:
- A = quantità di agente sferonizzante;
- B = quantità di Explotab CLV;
- C = quantità di lattosio;

Coefficienti di regressione, valori di R^2 e R^2_{adj}

Formulazioni contenenti Avicel CL611

$$Y = b_A X_A + b_B X_B + b_C X_C + b_{AB} X_A X_B + b_{AC} X_A X_C + b_{BC} X_B X_C$$

	Resa di processo (%)	d_{geo} (µm)	σ_{geo}	10% *interval fraction*	*Circularity*	*Roundness*	*Aspect ratio*	% disgregazione	$\%_{5\ minuti}$
b_A	75,57**	1088,78**	1,25**	65,56**	0,80**	0,81**	1,25**	12,56	35,07**
b_B	220,45	1567,59	4,95*	-417,81*	1,09	0,55	1,78	-447,99	28,57
b_C	46,60**	771,85**	1,32**	48,26	0,81**	0,77**	1,29**	94,70**	40,93**
b_{AB}	-272,30	-1934,11	-4,68	562,13	-0,53	0,10	-0,25	982,45*	329,55
b_{AC}	83,40	1842,35*	-0,52	-88,70	0,23	0,61*	-0,84	78,23	19,75
b_{BC}	-270,41	-3935,09	-1,95	581,88	-0,78	-0,57	0,62	640,98	411,71
R^2	0,678	0,886	0,903	0,759	0,673	0,855	0,859	0,975	0,970
R^2_{adj}	0,142	0,696	0,740	0,378	0,127	0,613	0,623	0,964	0,919

* = $p < 0,10$
** = $p < 0,05$

Coefficienti di regressione, valori di R^2 e R^2_{adj}

Formulazioni contenenti Vivapur MCG811

$$Y = b_A X_A + b_B X_B + b_C X_C + b_{AB} X_A X_B + b_{AC} X_A X_C + b_{BC} X_B X_C$$

	Resa di processo (%)	d_{geo} (µm)	σ_{geo}	10% *interval fraction*	*Circularity*	*Roundness*	*Aspect ratio*	% disgregazione	$\%_{5minuti}$
b_A	78,30**	1134,76**	1,12**	66,10**	0,83**	0,85**	1,18**	42,96**	35,07**
b_B	-291,27**	-1137,63	2,08	-270,83	0,42	1,26	0,79	230,13	28,57
b_C	63,67**	1113,23**	1,19**	44,48**	0,88**	0,91**	1,10**	93,08**	40,93**
b_{AB}	393,45**	1697,54	-0,44	377,63	0,31	-0,93	1,12	-90,83	329,55
b_{AC}	49,03**	516,12**	0,00	22,40	0,07	0,20	-0,27	30,60	19,75
b_{BC}	316,35**	-9,58	0,85	277,36	-0,02	-1,49	1,94	-48,89	411,71
R^2	0,996	0,990	0,963	0,662	0,879	0,947	0,929	0,983	0,970
R^2_{adj}	0,988	0,974	0,902	0,099	0,677	0,857	0,812	0,954	0,919

* = $p < 0,10$
** = $p < 0,05$

OTTIMIZZAZIONE

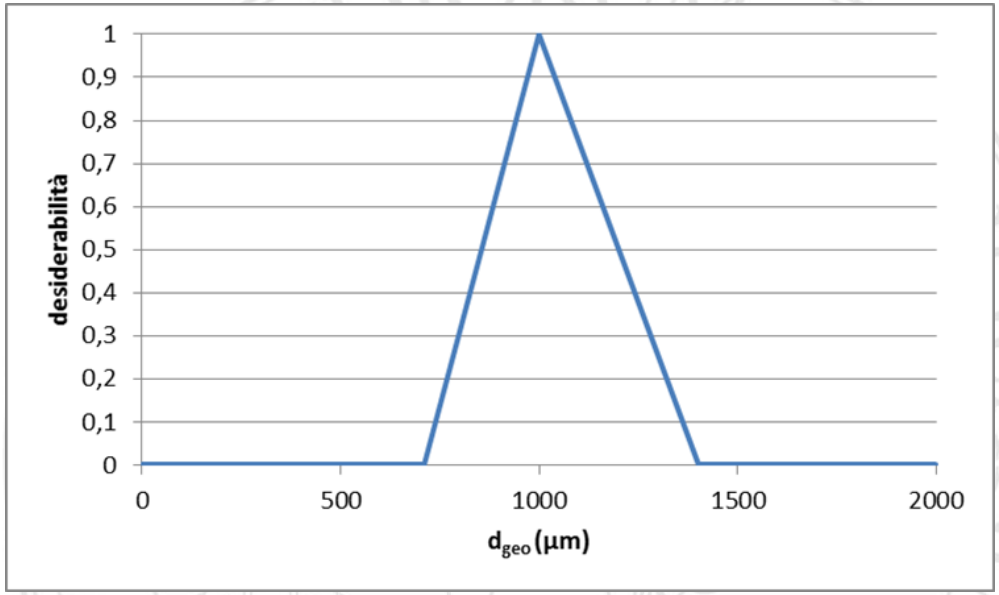
Applicazione della FUNZIONE DI DESIDERABILITA'

E' un metodo efficace e preciso
(vs superfici di risposta)

Ogni variabile è associata una funzione di
DESIDERABILITA' INDIVIDUALE (d)

$0 < d < 1$

Esempio: funzione di desiderabilità individuale per la variabile $\mathbf{d_{geo}}$



OTTIMIZZAZIONE

Il miglioramento di alcune risposte può comportare il peggioramento di altre, poiché i livelli dei fattori ottimali per una risposta possono non esserlo per un'altra

↓

Necessario trovare il miglior compromesso tra le risposte per ottenere un'ottimizzazione simultanea di tutte le variabili

↓

Applicazione della funzione di
DESIDERABILITA' COMPLESSIVA (D)

$$\mathbf{D = d_1^{0,075} * d_2^{0,1} * d_3^{0,1} * d_4^{0,075} * d_5^{0,05} * d_6^{0,05} * d_7^{0,05} * d_8^{0,25} * d_9^{0,25}}$$

↓ Combinazione di tutte le funzioni di desiderabilità individuali relative alle variabili risposta

↓ Media geometrica ponderata delle funzioni individuali

FORMULAZIONI OTTIMALI

Combinazione ottimale dei livelli delle variabili indipendenti

	Livello	Quantità (g)
Avicel CL611	0,531	3,717
Explotab CLV	0,163	1,141
Lattosio	0,306	2,142

	Livello	Quantità (g)
Vivapur MCG811	0,406	2,842
Explotab CLV	0,143	1,001
Lattosio	0,452	3,164

Formulazioni ottimali

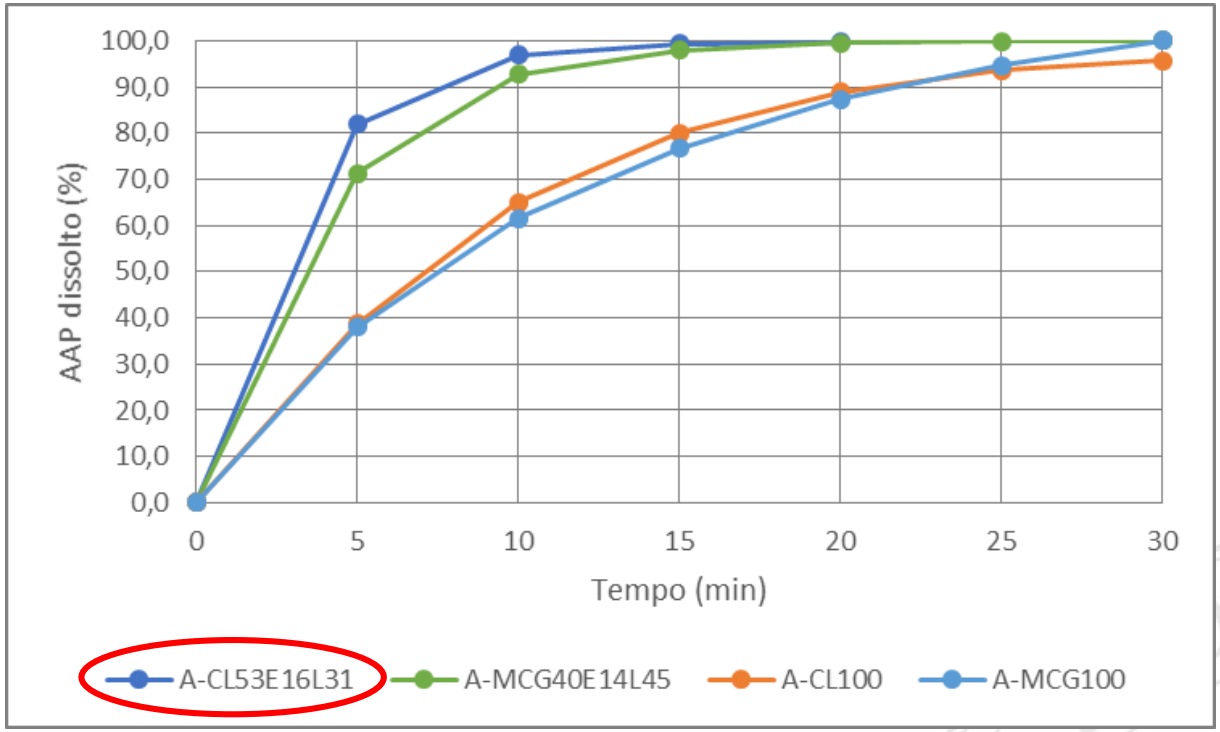
Caratterizzazione dei *pellets* (n=3)

Pellets con Avicel CL611

	Valore medio sperimentale	CV%	Valore calcolato	Δ%
Resa proc. (%)	70,2	4,6	66,8	4,87
d_{geo} (µm)	1042	5,07	1006	3,49
σ_{geo}	1,29	1,8	1,29	0,00
10% *IF*	53,6	10,7	44,7	16,54
Circularity	0,75	16,0	0,81	-7,77
Roundness	0,85	2,6	0,83	1,38
Aspect ratio	1,19	3,1	1,22	-2,31
% disgreg.	91,4	5,8	92,3	-1,04
$\%_{5min}$	81,9	12,6	88,1	-7,55

Pellets con Vivapur MCG811

	Valore medio sperimentale	CV%	Valore calcolato	Δ%
Resa proc. (%)	73,3	2,5	71,2	2,90
d_{geo} (µm)	1015	6,3	994	2,12
σ_{geo}	1,27	7,4	1,32	-3,71
10% IF	62,0	14,7	52,2	15,86
Circularity	0,81	2,2	0,82	-1,70
Roundness	0,83	0,9	0,82	1,18
Aspect ratio	1,21	0,9	1,33	-9,99
% disgreg.	95,3	2,9	89,6	5,95
$\%_{5min}$	71,3	12,6	81,9	-14,95



Profili di dissoluzione di paracetamolo

La formulazione a base di Avicel CL611 è stata selezionata.

↓

Preparazione di *pellets* veicolanti nanoparticelle placebo.

Risultati

	O-NPs placebo	NPs placebo
Resa di processo (%)	41,0	60,3
Resa 710-1400 µm (%)	71,2	92,2
d_{geo} (µm)	783	908
σ_{geo}	1,29	1,21
10% *interval fraction*	49,2	48,9
Circularity	0,74	0,70
Roundness	0,74	0,75
Aspect ratio	1,38	1,36
% disgregazione	26,4	10,8

% di disgregazione molto maggiore!

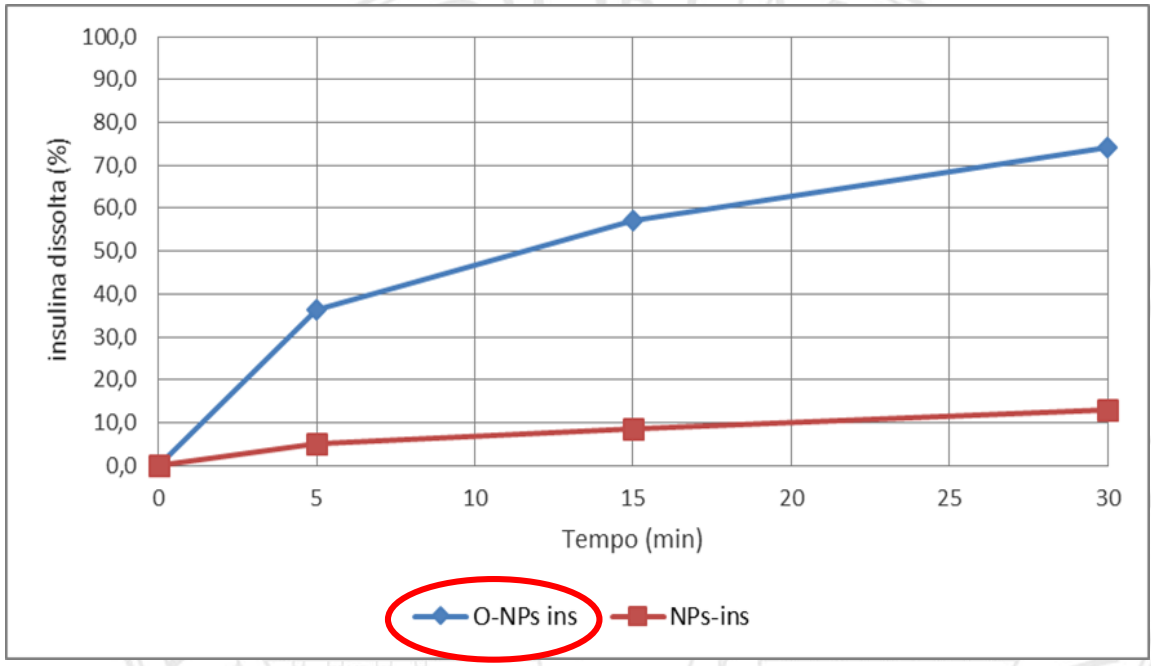
↓

Preparazione di *pellets* con nanoparticelle veicolanti insulina

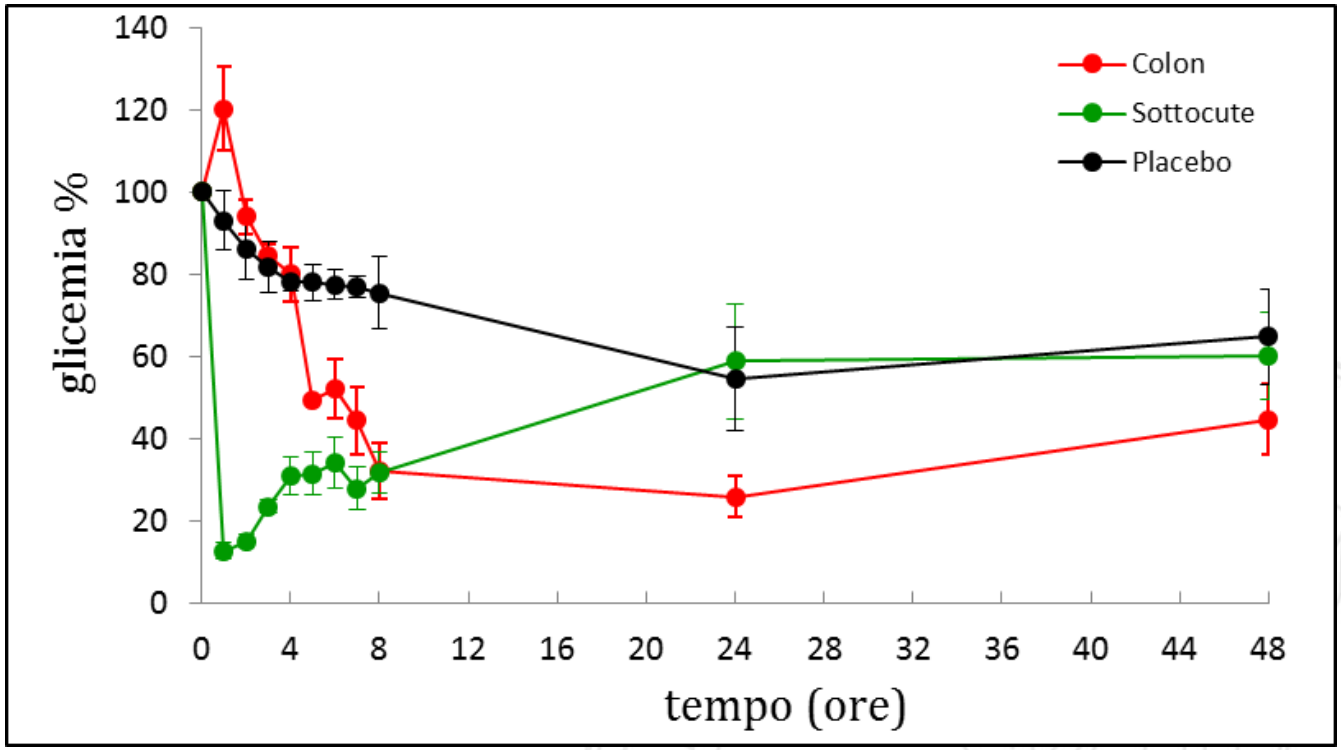
Risultati

	O-NPs ins	NPs ins
Resa di processo (%)	63,3	47,1
Resa 710-1400 µm (%)	94,8	69,5
d_{geo} (µm)	1134	723
σ_{geo}	1,34	1,42
10% *interval fraction*	41,2	44,2
Circularity	0,84	0,84
Roundness	0,87	0,84
Aspect ratio	1,16	1,21
$\%_{5minuti}$	36,2	5,3

Risultati ottenuti dalla caratterizzazione dei *pellets* con nanoparticelle veicolanti insulina



PROVE PRELIMINARI *IN VIVO*



Prove effettuate su ratti trattati con streptozotocina per indurre loro il diabete.

CONCLUSIONI

Ottenimento di una formulazione adatta alla preparazione di *pellets* caratterizzati da un'elevata capacità disgregante e una soddisfacente velocità di passaggio in soluzione dell'insulina, confermata da prove *in vivo*.

PROSPETTIVE FUTURE

Ulteriori studi volti alla comprensione dei meccanismi che stanno alla base del processo di passaggio in soluzione del principio attivo dai *pellets*.

Applicazione della piattaforma formulativa per la somministrazione di altri peptidi.

Ringraziamenti

Dr.ssa Miriam Colombo
College of Pharmacy and Pharmaceutical Technology
Freie Universität, Berlin

Prof. Davide Prosperi
Dr.ssa Miriam Colombo
Dr.ssa Lucia Salvioni
NanoBioLab
Università degli Studi di Milano Bicocca

Prof. Fabio Corsi
Dr.ssa Luisa Fiandra
Raffaele Allevi
Ospedale L. Sacco
Università degli Studi di Milano

La filosofia è scritta in questo grandissimo libro che continuamente ci sta aperto innanzi agli occhi (io dico l'universo), ma non si può intendere se prima non s'impara a intendere la lingua, a conoscere I caratteri, ne' i quali è scritto. Egli è scritto in lingua matematica, e i caratteri son triangoli, cerchi ed altre figure geometriche, senza i quali mezzi è impossibile a intenderne umana parola; senza questi è un aggirarsi vanamente per un oscuro labirinto

Galileo Galilei