



**AZIENDA OSPEDALIERA
UNIVERSITARIA SENESE**

Policlinico S. Maria alle Scotte



Allestimento di farmaci off-label: voriconazolo collirio – problemi formulativi

Siena, 10-15 Dicembre 2009

Ordine dei Farmacisti



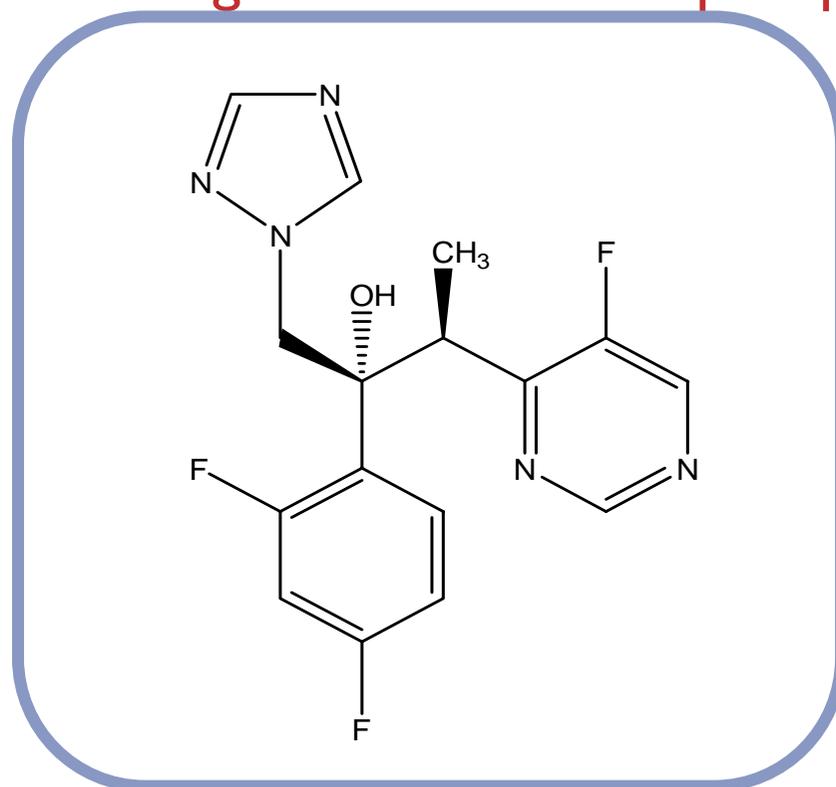
Coordinatore nazionale

Area Galenica Clinica SIFO



VORICONAZOLO

Agente antifungino triazolico
di seconda generazione ad ampio spettro



(2R,3S)-2-(2,4-difluorofenil)-3-(5-fluoro-4-pirimidin)-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-2-butan-2-olo

➤ Meccanismo d'azione: inibisce l'enzima 14 α -metil-lanosterolo-demetilasi, citocromo P450 dipendente coinvolto nella sintesi dell'ergosterolo, nella membrana citoplasmatica dei funghi. Impedendo la biosintesi dell'ergosterolo, si accumulano 14 α -metilsteroli che possono distruggere la struttura dei fosfolipidi di membrana, bloccando l'accrescimento dei funghi.

➤ L'efficacia clinica è stata dimostrata per *Aspergillus spp.* (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. niger* e *A. nidulans*), *Candida spp.* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. Krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e in numero limitato *C. dubliniensis*, *C. inconspicua*, *C. guilliermondii*), *Scedosporium spp.* (*S. apiospermum*, *S. prolificans*) e *Fusarium spp.*



➤ Uso:

- aspergillosi invasive da *Aspergillus fumigatus*
- candidosi esofagee
- infezioni da *Candida albicans* fluconazolo resistenti in pazienti immunocompromessi
- infezioni da *Scedosporium spp.* e *Fusarium spp.* (incluso *Fusarium Solani*)
- in pazienti intolleranti o refrattari ad altre terapie

➤ Medicinali commercializzati:

- Vfend® (Pfizer Italia Srl) compresse film rivestite da 50 e 200 mg
- Vfend® (Pfizer Italia Srl) flacone con 200 mg polvere per soluzione per infusione intravenosa
- Vfend® (Pfizer Italia Srl) 40 mg/ml polvere per sospensione orale

MEDICINALI OFF- LABEL

In ambiente ospedaliero è frequente l'uso di principi attivi contenuti in medicinali industriali, per indicazioni, vie o modalità di somministrazione diverse rispetto a quelle autorizzate in sede di registrazione.

Questo uso **off-label** dei medicinali registrati è regolamentato dalla Legge n.94 dell'08/04/1998, (legge Di Bella) art.3, comma 2:

“In singoli casi il medico può, sotto la sua diretta responsabilità, previa informazione del paziente ed acquisizione del consenso dello stesso, impiegare un medicinale per un' indicazione, o via di somministrazione, o modalità di somministrazione diverse da quelle autorizzate, in assenza documentabile di alternative, purché tale impiego sia noto e conforme a lavori su pubblicazioni scientifiche accreditate in campo internazionale”

USO OFF- LABEL DEL VORICONAZOLO

Un collirio antimicotico a base di voriconazolo viene impiegato in pazienti con infezioni gravi da ***Candida Albicans*** e ***Fusarium*** già trattati per via sistemica con tutte le strategie terapeutiche, destinati alla perdita totale della vista o in alcuni casi anche dell'occhio



SCOPI

- Allestire la formulazione di un collirio a base di voriconazolo valutandone stabilità, isotonia e sterilità
- Mettere a punto una nuova metodica analitica che sfrutta la polarografia differenziale pulsata (DPP) per la determinazione quantitativa del farmaco nelle sue forme farmaceutiche (comprese ed iniettabili)
 - Validazione della metodica analitica in termini di specificità, linearità, accuratezza e precisione

Allestimento del collirio a base di voriconazolo...

Metodo di preparazione

1. Ricostituire una fiala di Vfend[®] da 200 mg (200 mg Voriconazolo, 3200 mg Sulfobutiletere beta Ciclodestrina Sodica) con 10 ml di acqua p.p.i.
2. Prelevare la soluzione ottenuta con siringa da 10 ml e trasferita in flacone sterile.

Ambiente di grado A (secondo GMP Europee, Annex I) inserito in ambiente di grado C (F. U. XI Ed., N.B.P, Capitolo II)



I colliri in quanto destinati ad essere applicati sulla mucosa oculare e portati a diretto contatto con la congiuntiva e cornea, devono rispondere ad alcuni requisiti essenziali:

- La sterilità
- La preservazione dell'inquinamento microbico
- La tonicità
- Il pH

CONTROLLO DELLA STERILITÀ

Il collirio di voriconazolo è preparato in ambiente sterile;
prodotti di partenza e materiali sono sterili;
la formulazione viene usata entro il limite temporale definito dal sistema
convalidato



non è richiesto il saggio di sterilità (Cap. I I, N.B.P.)

Per verificare la sterilità del prodotto è sufficiente convalidare
la procedura di preparazione del collirio.

Il processo di convalida prevede di preparare 10 ml di soluzione usando le stesse procedure ed i materiali necessari per la preparazione del collirio di voriconazolo, ma senza utilizzare Vfend[®] e acqua p.p.i. e sostituendoli con soluzione fisiologica

Il campione preparato , è stato inviato in laboratorio di analisi microbiologica per l'incubazione dei terreni.



Questa operazione è stata eseguita per 3 volte in 3 giorni diversi e dopo incubazione il solo risultato accettabile è **“assenza di crescita”**

CALCOLO DELL'ISOTONIA DEL COLLIRIO ALLESTITO

L'isotonia è stata calcolata attraverso il calcolo del “fattore osmotico”(f) della soluzione, rappresentato con un valore proporzionale al numero di particelle presenti in 100 ml di soluzione.

$$f = \frac{n \times P}{PM}$$

dove f= fattore osmotico; P= g in 100 ml;
n= grado di dissociazione; PM= peso
molecolare

La **condizione di isotonia** è rappresentata da una soluzione di NaCl 0.9% per cui **f è uguale a 0.031**

- il fattore osmotico totale di una fiala di VFEND risulta essere $f_{Vfend}^{\text{®}} = 0.0209$, pertanto la prima formulazione allestita risulta ipotonica

NUOVA FORMULAZIONE (isotonica)

- 0.254 ml NaCl 11.6% p.p.i
- Acqua p.p.i q.b. a 10 ml (quindi 9.746 ml)
- 1 fiala di Vfend®

VERIFICA DELLA STABILITÀ

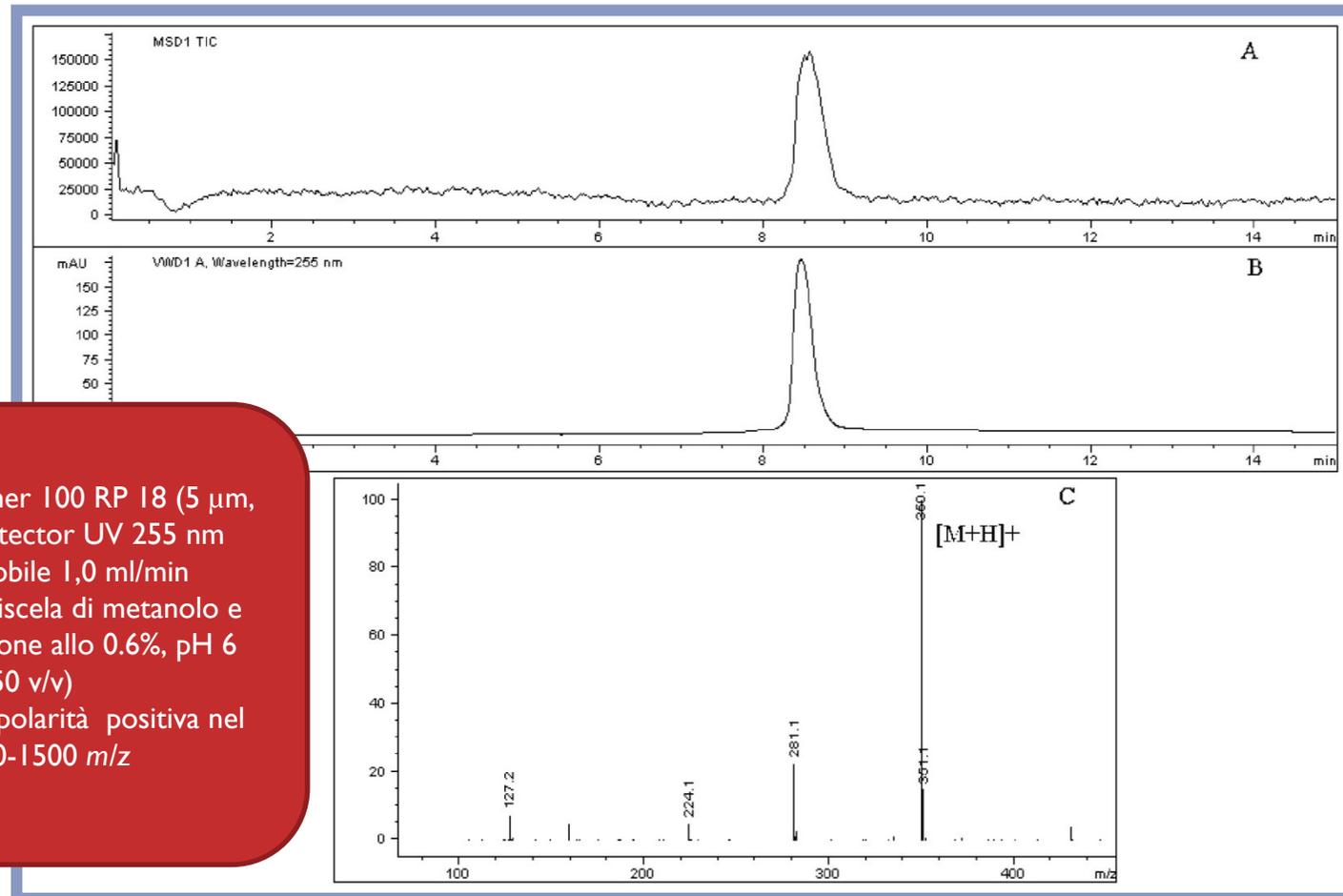
I. Estrazione del voriconazolo standard e valutazione del grado di purezza

- ❖ 1.5 g di Vfend[®] polvere per infusione intravenosa (pari a 88.2 mg di voriconazolo) posti in una provetta da centrifuga e solubilizzati in 5 ml di acqua.
- ❖ L'estrazione effettuata per 5 minuti in bagno ad ultrasuoni dopo addizione di 15 ml di diclorometano.
- ❖ Per separare la parte organica il campione è stato centrifugato (3000 rpm per 10 min) e il residuo ottenuto estratto nuovamente.
- ❖ La porzione organica è stata raccolta, evaporata con azoto e il composto isolato è stato conservato a -20 °C fino all'uso.

La valutazione del grado di purezza del voriconazolo standard è stata effettuata mediante LC/UV, LC/MS e DSC

ANALISI LC-MS

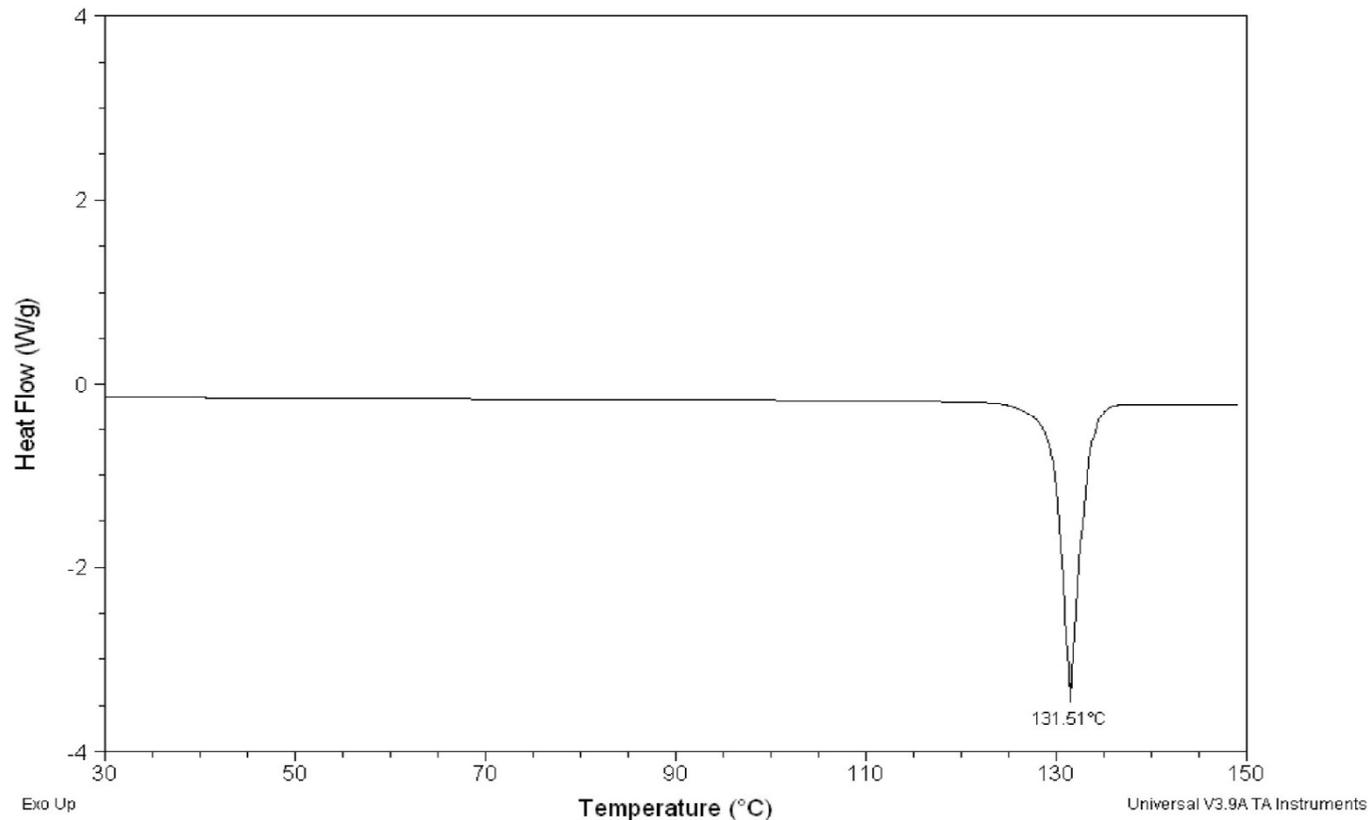
Profilo cromatografico ottenuto in LC-UV (a) e LC-MS (b)(TIC Total Ion Current) e spettro di massa (c) del voriconazolo standard



Colonna LiChrospher 100 RP 18 (5 μ m, 125 \times 4 mm) Detector UV 255 nm
Flusso fase mobile 1,0 ml/min
fase mobile una miscela di metanolo e trietilamina soluzione allo 0.6%, pH 6 (50:50 v/v)
Rivelazione MS in polarit  positiva nel range 100-1500 m/z

Il grado di purezza   risultato maggiore del 99%

ANALISI DSC (calorimetria differenziale a scansione)



Il campione è stato accuratamente pesato (5mg) e disposto in vaschette di alluminio rivestite. L'azoto è stato usato ad una portata di 50 mL/min per la cella DSC e 100 mL/min per il sistema di refrigerazione. L'analisi è stata effettuata usando un gradiente di temperatura da 30°C a 150°C con un incremento pari a 5°C/min. Strumento impiegato: DSC Q1000 (AT, Newcastle, DE).

2. Preparazione dei campioni

Da 5 compresse di Vfend® è stata pesata la quantità di polvere corrispondente a 250 mg di voriconazolo e trasferita in matraccio da 25 ml, in cui sono stati aggiunti 10 ml di metanolo, quindi posto in bagno ad ultrasuoni per 5 min e portato a volume con metanolo.

Depositati gli eccipienti indisciolti, parte del supernatante limpido è stato diluito con metanolo ottenendo una soluzione di lavoro con concentrazione di 1 mg/ml.

L'analisi del campione di Vfend® iniettabile è stata eseguita come per le compresse, usando però acqua distillata per dissolvere il campione e metanolo per ottenere la soluzione di lavoro.

3. Analisi quantitativa del voriconazolo con polarografia differenziale pulsata

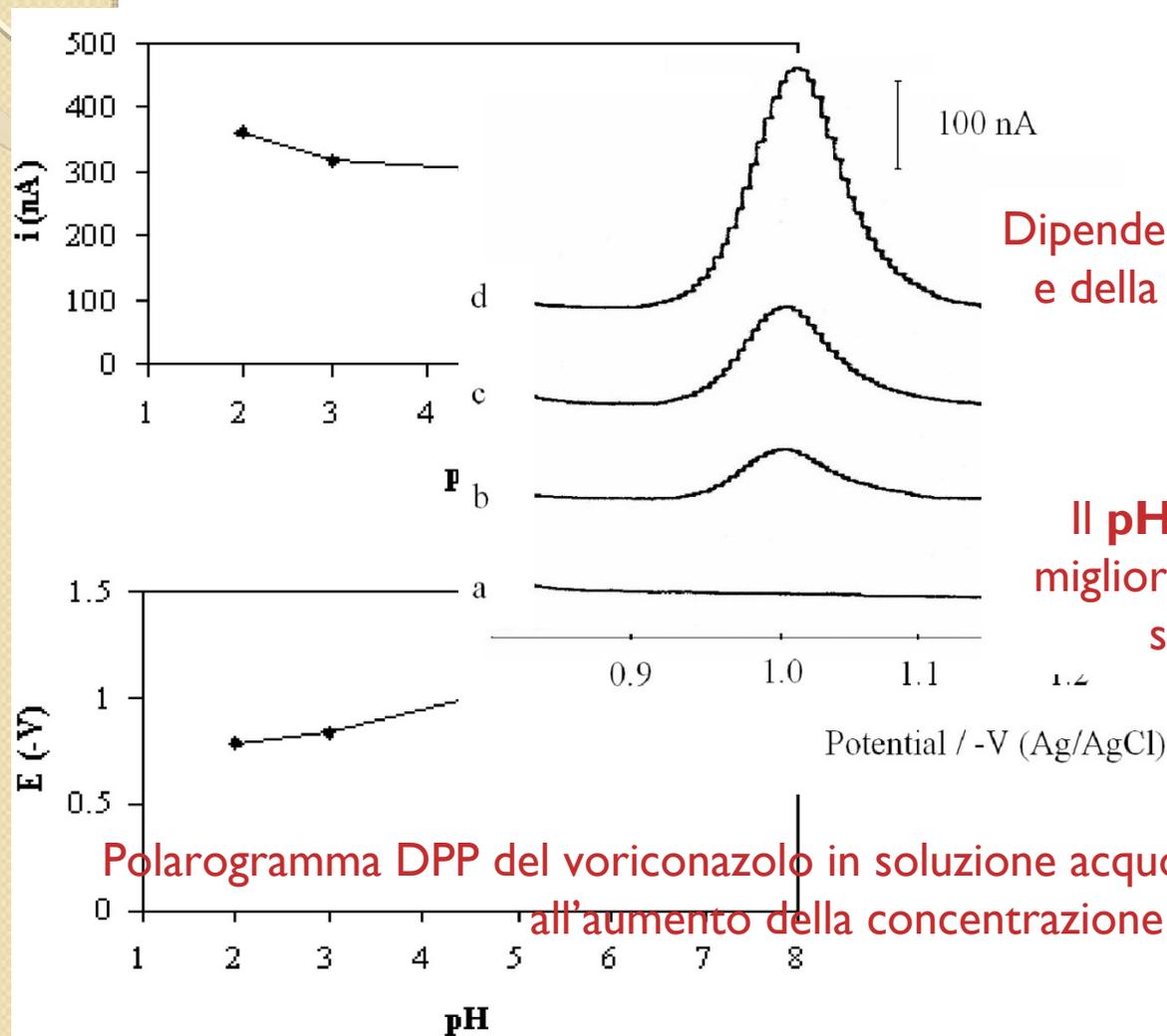
Condizioni per l'analisi:

Polarografo EG & G (PAR) modello 264A, con un elettrodo a mercurio a goccia stazionaria EG & G (PAR) modello 303A e un registratore x-y modello EG & G (PAR) RE0073.

Un volume noto (10 mL) dell'elettrolita di supporto (0.01M KH_2PO_4 in acqua, pH 4.5) è stato posto nella cella polarografica precedentemente deossigenata per 10 minuti con azoto puro saturato con acqua.

25 μl della soluzione campione sono stati trasferiti nella cella polarografica contenente 10 ml di un elettrolita di supporto per ottenere una concentrazione finale di 2.5 $\mu\text{g/ml}$ e analizzata usando DPP.

4. Sviluppo e ottimizzazione del metodo DPP



Dipendenza del potenziale di picco E_p e della corrente di diffusione I_p dal

pH



Il **pH 4.5** è stato scelto come il miglior compromesso in termini di sensibilità e ripetibilità.

Polarogramma DPP del voriconazolo in soluzione acquosa di KH_2PO_4 0.01 M all'aumento della concentrazione

5. Validazione della metodica analitica

La validazione di questo metodo analitico è stata eseguita valutando:

- PRECISIONE
- SPECIFICITÀ
- LINEARITÀ
- ACCURATEZZA

Parametri	Risultati
Range di concentrazione ($\mu\text{g/mL}$)	0.5-5.0
Pendenza	103.81
Intercetta	2.028
Coefficiente di correlazione	0.999
S.D. dell'intercetta S_a	1.070
S.D. della pendenza S_b	0.335
S.D. dei residui $S_{y/x}$	2.25
Numero di osservazioni	3
LOD ($\mu\text{g/mL}$) (Limite di rivelazione)	0.03
LOQ ($\mu\text{g/mL}$) (limite di quantificazione)	0.10
Ripetibilità (%RSD)	0.51
Precisione intermedia (%RSD)	0.94

SPECIFICITÀ

- I risultati dell'analisi di un campione di farmaco puro e delle forme farmaceutiche sono stati confrontati con i risultati ottenuti con concentrazioni crescenti di significatività. La ripetibilità è stata valutata nella stessa giornata e la precisione intermedia tra giorni diversi in questo significato di analizzando 5 soluzioni standard per 5 giorni consecutivi.

$$R^2 = 0.999$$

il metodo proposto può essere considerato **selettivo** per la determinazione del voriconazolo nelle forme farmaceutiche.

ACCURATEZZA

Concentrazione teorica (µg/mL)	Vfend® compresse			Vfend® iniettabili		
	Recupero (%)	Media	% RSD	Recupero (%)	Media	% RSD
2.0	100.53 100.64 100.12	100.43	0.27	100.23 100.19 100.74	100.39	0.31
2.5	100.57 99.89 100.20	100.22	0.34	99.48 100.47 100.48	100.14	0.57
3.0	100.00 99.87 98.65	99.51	0.74	100.35 100.47 100.01	100.28	0.24

Il metodo risulta accurato in quanto il recupero percentuale è sempre compreso nell'intervallo 95%-105%

L'accuratezza è stata valutata effettuando studi di recupero ottenuti aggiungendo quantità note di voriconazolo std alla soluzione di un campione contenente il farmaco.

Analisi quantitativa del voriconazolo in forme farmaceutiche

Formulazioni farmaceutiche	Recupero% \pm S.D. ^a	
	Metodo DPP	Metodo LC
Vfend® compresse	100.78 \pm 1.12 $F = 1.12$ $t = 0.49$	100.42 \pm 1.19
Vfend® iniettabili	100.96 \pm 1.01 $F = 1.38$ $t = 0.77$	

^a Media di cinque determinazioni:

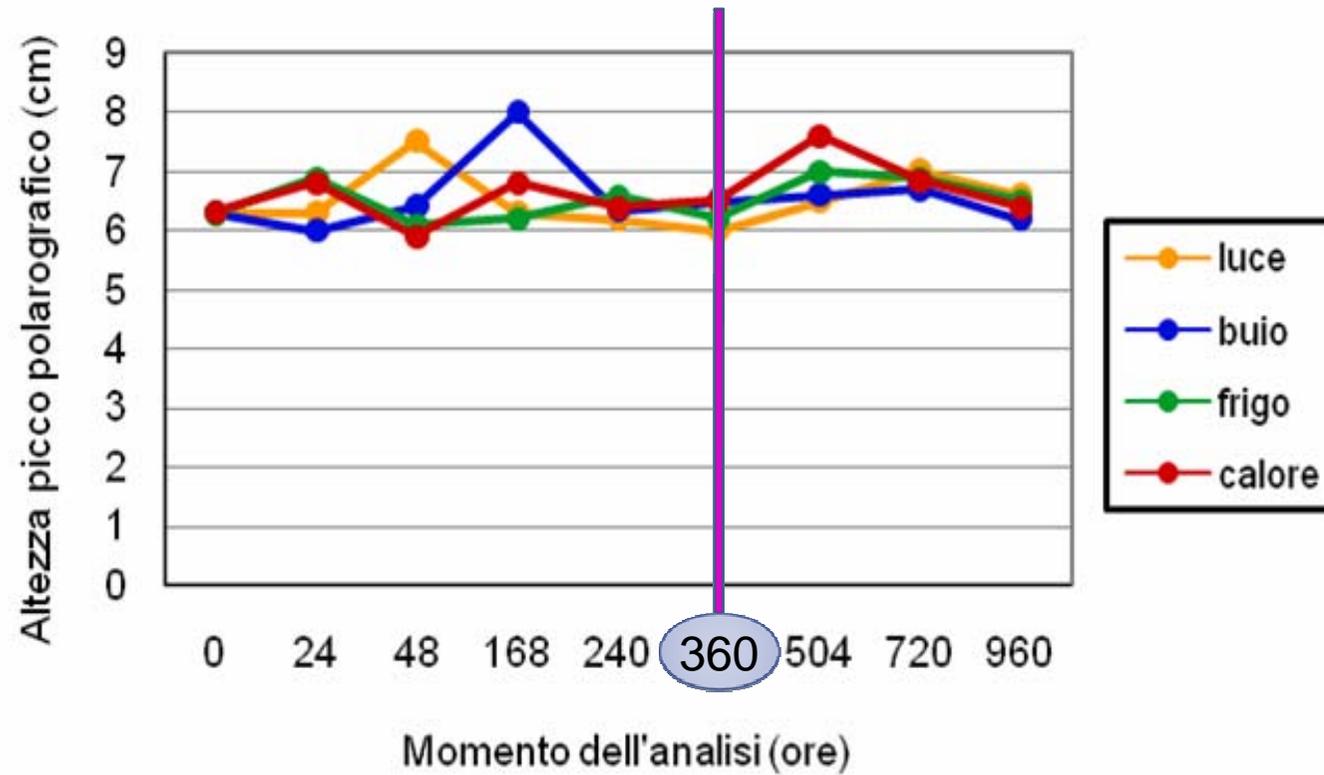
- valore teorico $F = 6.39$ al 95% di probabilità
- valore teorico $t = 2.31$ al 95% di probabilità

I risultati ottenuti dalle analisi quantitative fatte con DPP e LC sono state confrontate usando alcuni test statistici (t -test e F test) effettuati ad un 95% di significatività. Non sono state trovate differenze significative

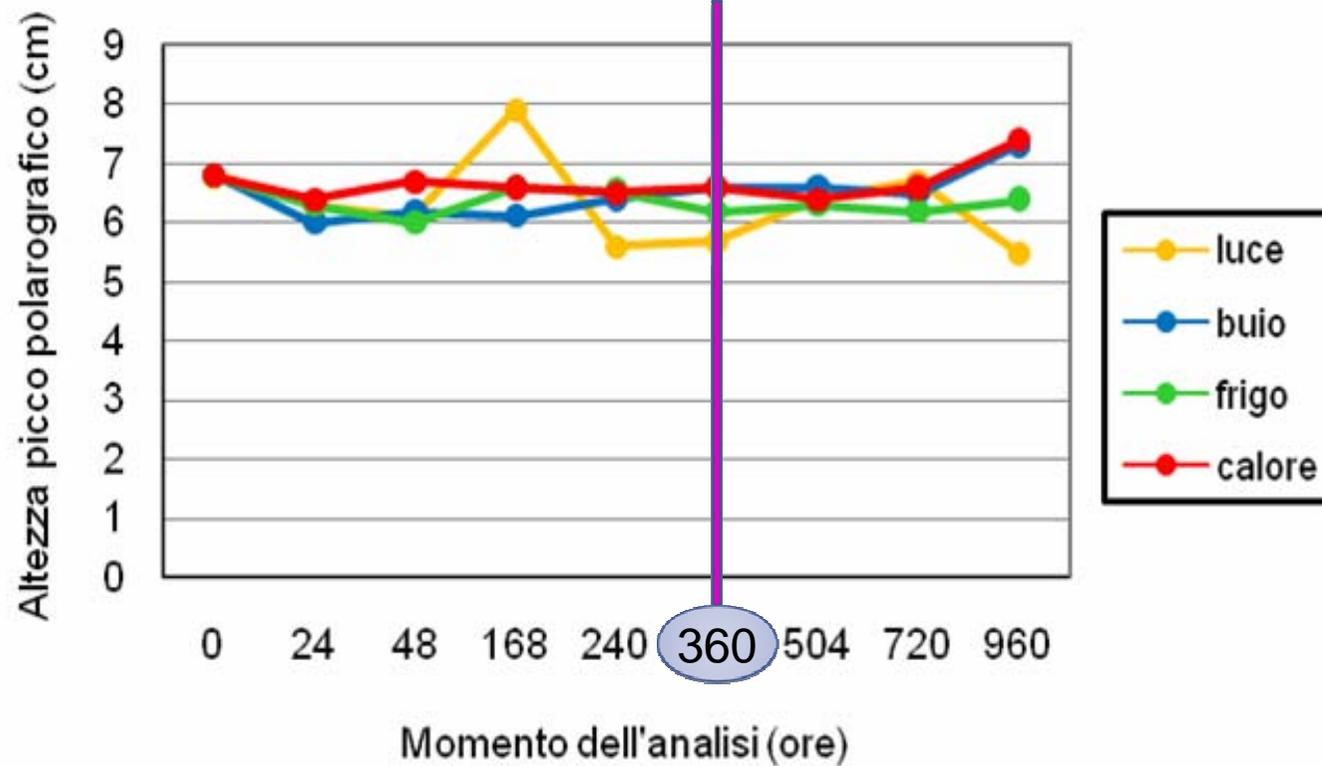
CONTROLLO DELLA STABILITA'

- Dopo aver convalidato la metodica sono state create 4 diluzioni, del collirio IPOTONICO e di quello ISOTONICO, e mantenute in 4 condizioni diverse: luce, buio a temperatura ambiente, frigorifero e forno a 34°C.
- prelievi costanti (25µl) di ogni diluizione sono stati posti quotidianamente nella cella polarografica.

Stabilità del collirio IPOTONICO a base di voriconazolo



Stabilità del collirio ISOTONICO a base di voriconazolo



CONCLUSIONI

- ❖ Dai risultati ottenuti si può affermare che il metodo polarografico messo a punto può essere considerato *utile, rapido* e di *semplice esecuzione* per l'analisi del voriconazolo in forme farmaceutiche (comprese ed iniettabili)
- ❖ L'impiego del metodo DPP è risultato interessante per effettuare studi sulla stabilità del collirio a base di voriconazolo e ha permesso di dare un limite di uso certo alla preparazione
- ❖ Da un punto di vista tecnologico il calcolo dell'isotonia ha permesso di formulare un collirio isotonico, quindi meglio tollerato rispetto alla prima formulazione del collirio, allestito in emergenza, risultato ipotonico
- ❖ La convalida del processo di preparazione ha permesso di verificare la sterilità, garantendo un prodotto finale privo di microrganismi