

# TALLER

# ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA **IN VITRO**

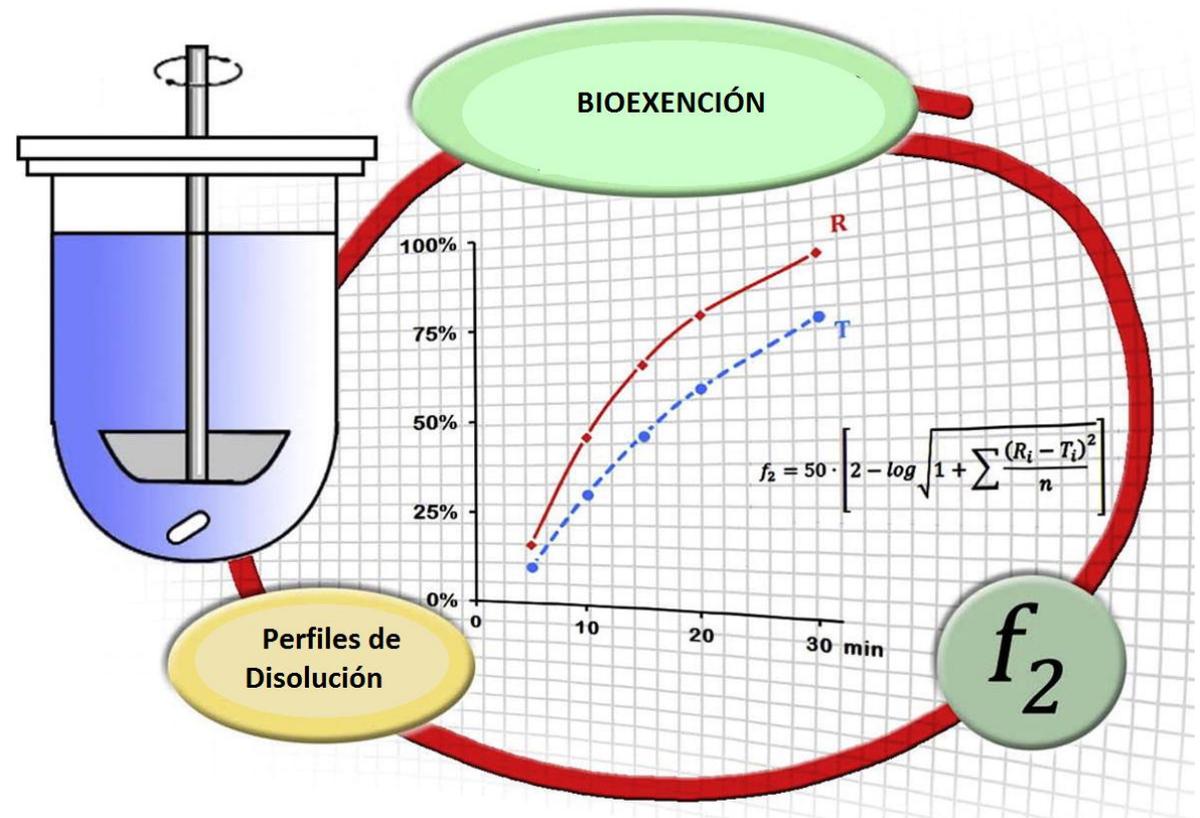
# **SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA**

Nelson Rodríguez MSc

Octubre 2025

# BIOEXENCIÓN

- Es un proceso mediante el cual se exige al fabricante de la presentación de estudios *in vivo* para la demostración de equivalencia terapéutica, cuando **cumpla con todos los requisitos** y una vez se aprueba, se acepta la presentación de perfiles de disolución *in vitro*.<sup>(1)</sup>



(1) Decreto Ejecutivo N° 27 de 10 de mayo de 2024. Gaceta Oficial N° 30028-C

# TIPOS DE BIOEXENCIÓN<sup>(1)</sup>

- ❖ Bioexención basada en la proporcionalidad de dosis. (Artículo 95, numeral 1)
- ❖ Bioexención basada en cambios post-aprobación. (Artículo 95, numeral 5)
- ❖ Bioexención basada en el SCB (Artículo 95, numeral 2 y 3)
- ❖ Bioexención basada en correlaciones in vivo-in vitro. (Artículo 95, numeral 4)

(1) Decreto Ejecutivo N° 27 de 10 de mayo de 2024. Gaceta Oficial N° 30028-C

# BIOEXENCIÓN: SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA

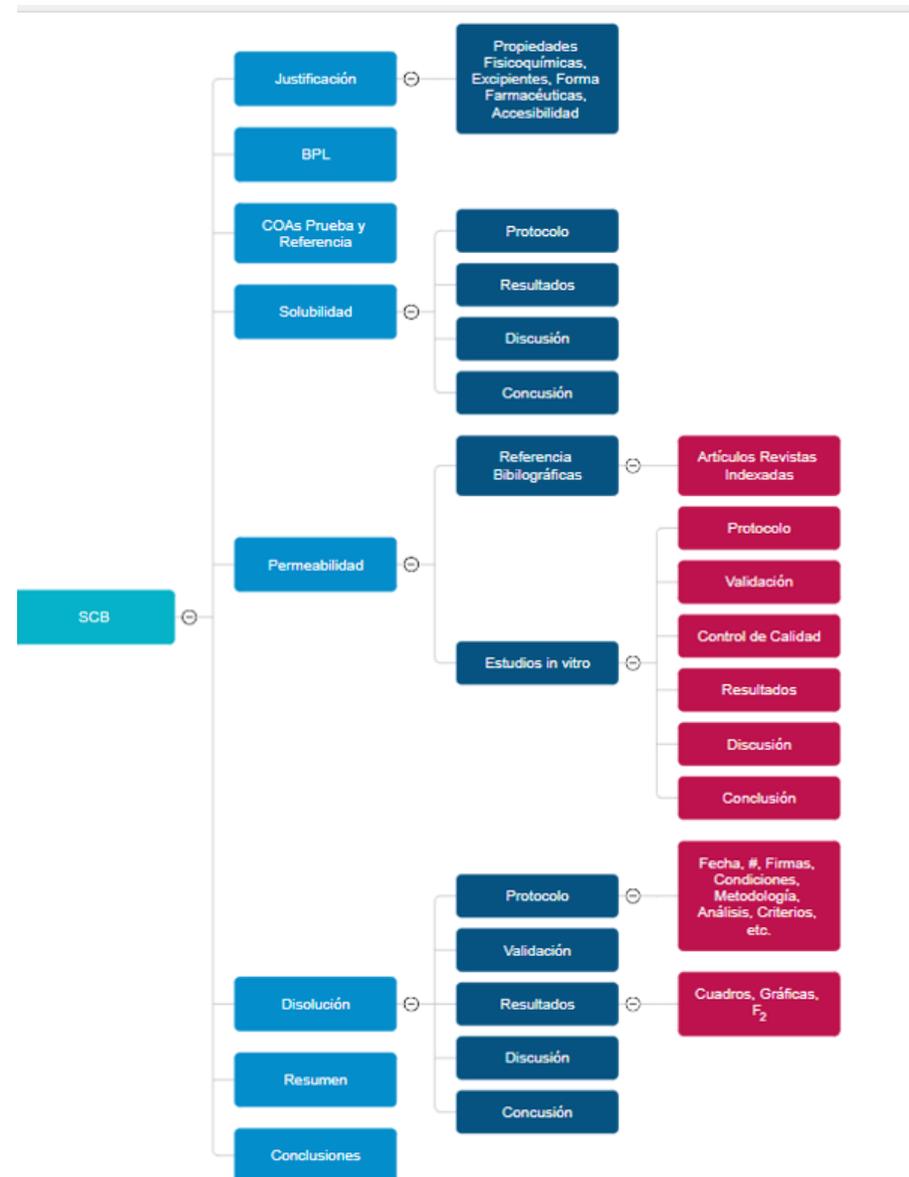
**CLASE I**  
**ALTA SOLUBILIDAD**  
**ALTA PERMEABILIDAD**

**CLASE II**  
**BAJA SOLUBILIDAD**  
**ALTA PERMEABILIDAD**

**CLASE III**  
**ALTA SOLUBILIDAD**  
**BAJA PERMEABILIDAD**

**CLASE IV**  
**BAJA SOLUBILIDAD**  
**BAJA PERMEABILIDAD**

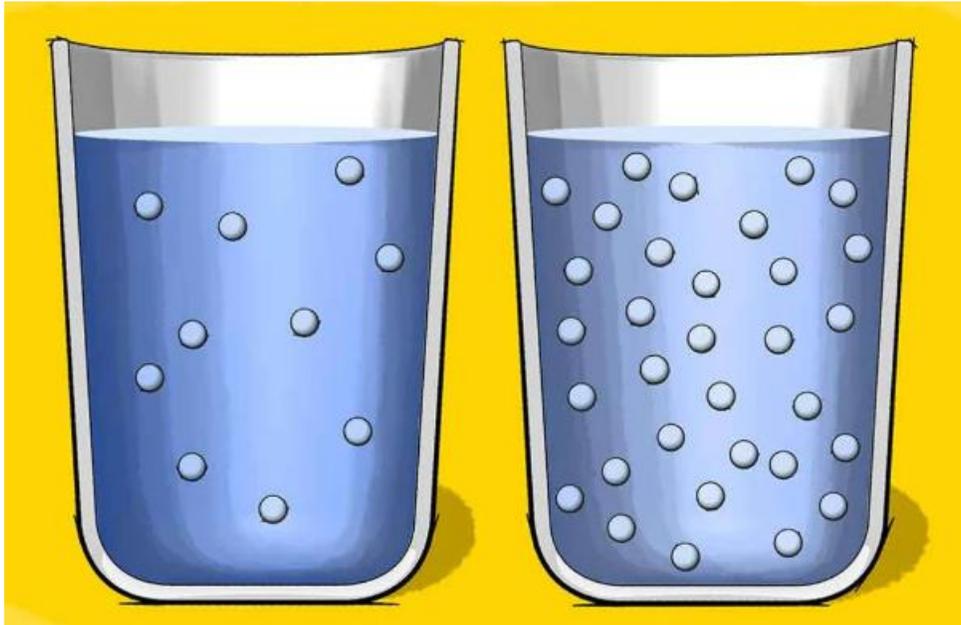
# BIOEXENCIÓN: SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA



# BIOEXENCIÓN: SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA

## ➤ Solubilidad:

- Agua
- Amortiguadores Acuosos a pHs de 1.2; 4,5 y 6.8
- Relación Dosis/Solubilidad a pHs de 1.2; 4,5 y 6.8



$$D_o = \frac{M_o / 250}{C_s}$$

$D_o$  = Número de dosis

$M_o$  = Dosis máxima (mg)

$C_s$  = Solubilidad intrínseca (mg/mL)

Volumen de solubilidad de la dosis más alta =  $\frac{\text{Potencia más alta}}{\text{Menor solubilidad reportada}}$

# BIOEXENCIÓN: SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA

## ➤ Permeabilidad:

- Artículos de revistas indexadas



Article

### Biomimetic Artificial Membrane Permeability Assay over Franz Cell Apparatus Using BCS Model Drugs

Leonardo de Souza Teixeira <sup>1,†</sup>, Tatiana Vila Chagas <sup>2,†</sup>, Antonio Alonso <sup>3</sup>, Isabel Gonzalez-Alvarez <sup>4</sup>, Marival Bermejo <sup>4</sup>, James Polli <sup>5</sup> and Kénnia Rocha Rezende <sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Pharmaceutical Sciences, Goiânia, Goiás 74175-100, Brazil; leonardo.teixeira@icf.com.br  
<sup>2</sup> Laboratory of Biopharmacy and Pharmacokinetics (BioPK), Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás 74175-100, Brazil; tatianavchagas@gmail.com  
<sup>3</sup> Institute of Physics, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás 74175-100, Brazil; alonso2233@gmail.com  
<sup>4</sup> Department of Engineering, Pharmacy Section, Miguel Hernandez University, 03550 Alicante, Spain; isabel.gonzalez@goum.umh.es (I.G.-A.); mbermejo@umh.es (M.B.)  
<sup>5</sup> Faculty of Pharmacy, University of Maryland, Baltimore, MD 21021, USA; jpolli@rx.umaryland.edu  
 \* Correspondence: kennia@ufg.br; Tel.: +55-(62)-98117-9445  
 † These authors contribute equally to this paper.

Received: 8 September 2020; Accepted: 10 October 2020; Published: 19 October 2020



**Abstract:** A major parameter controlling the extent and rate of oral drug absorption is permeability through the lipid bilayer of intestinal epithelial cells. Here, a biomimetic artificial membrane permeability assay (Franz–PAMPA Pampa) was validated using a Franz cells apparatus. Both high and low permeability drugs (metoprolol and mannitol, respectively) were used as external standards. Biomimetic properties of Franz–PAMPA were also characterized by electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR). Moreover, the permeation profile for eight Biopharmaceutic Classification System (BCS) model drugs cited in the FDA guidance and another six drugs (acyclovir, cimetidine, diclofenac, ibuprofen, piroxicam, and trimethoprim) were measured across Franz–PAMPA. Apparent permeability (Papp) Franz–PAMPA values were correlated with fraction of dose absorbed in humans (Fa%) from the literature. Papp in Caco-2 cells and Corti artificial membrane were likewise compared to Fa% to assess Franz–PAMPA performance. Mannitol and metoprolol Papp values across Franz–PAMPA were lower ( $3.20 \times 10^{-7}$  and  $1.61 \times 10^{-5}$  cm/s, respectively) than those obtained across non-impregnated membrane ( $2.27 \times 10^{-5}$  and  $2.55 \times 10^{-5}$  cm/s, respectively), confirming lipidic barrier resistivity. Performance of the Franz cell permeation apparatus using an artificial membrane showed acceptable log-linear correlation ( $R^2 = 0.664$ ) with Fa%, as seen for Papp in Caco-2 cells ( $R^2 = 0.805$ ). Data support the validation of the Franz–PAMPA method for use during the drug discovery process.

**Keywords:** Franz–PAMPA; BCS drugs; biomimetic membrane; Franz cell; passive drug transport

Drug	<sup>5</sup> BCS	<sup>1</sup> Fa(%)	Papp × 10 <sup>-6</sup> cm/s					<sup>3</sup> PAMPA pH 7,4	<sup>3</sup> Permeapad™	<sup>5</sup> LogP	<sup>5</sup> Log D pH 7.4	<sup>5</sup> pKa	<sup>4,5</sup> Intrinsic Solubility (mg/mL)
			Franz–PAMPA	Non-Sink Arthurson	<sup>1</sup> Caco-2	<sup>2</sup> Corti							
Metoprolol	I	95	15.8 (HP)	59.0	23.7 (HP)	48.1 (HP)	3.5	1.0	1.9	−0.2	9.6	1000.0	
Caffeine		100	36.2 (HP)	53.3	30.8 (HP)	41.1	10.8	20.4	−0.1	0.02	0.6	21.17	
Propranolol		93	33.1 (HP)	88.4	41.9 (HP)	39.7	23.5	nC	2.65	1.3	9.5	33.0	
Theophylline		97	22.1 (HP)	—	25.0 (HP)	40.5	—	7.2	−0.25	−0.05	0.6 & 8.55	8.33	
Carbamazepine	II	100	5.97	—	-	-	11.3	nC	2.5	1.8	1.0 & 13.9	0.12	
Diclofenac		100	68.1 (HP)	104.9	-	-	12.5	nC	4.4	1.2	3.99	0.001	
Ibuprofen		93	57.5 (HP)	36.0	52.5 (HP)	-	6.8	16.6	3.1	0.7	4.9	0.01	
Ketoprofen (AT)		100	12.1	—	20.1	42.7	16.7	nC	3.3	−1.51	4.5	0.051	
Naproxen		98	2.89 (HP)	1.7	39.5 (HP)	48.8 (HP)	10.6	nC	3.2	0.2	4.2	33.0	
Piroxicam		100	11.0	9.6	35.6 (HP)	-	8.2	nC	2.0	−0.07	2.33 & 5.1	0.11	
Verapamil (AT)		98	5.39	5.0	15.8	41.6	7.4	9.3	3.8	2.7	8.9	0.44	
Atenolol		52	25.8 (HP)	22.0	0.2	20.9	0.0	4.3	0.2	0.4	9.6	26.5	
Cimetidine		93	35.6 (HP)	31.0	0.7	-	0.0	nC	0.4	0.4	6.8	6.0	
Methyldopa		41	—	—	0.2	3.2	-	nC	0.4	-	1.7 & 9.9	10.0	
Ranitidine (AT)	55	6.81	5.3	0.5	21.5	0.5	nC	0.3	−0.3	2.1 & 8.1	100.0		
Acyclovir	IV	21	0.40	0.4	0.3	9.1	0.0	7.9	−1.7	−1.7	2.3 & 9.3	10.0	
Amoxicillin		93	0.85	0.07	0.8	-	1.5	nC	0.9	—	3.2 & 11.7	4.0	
Furosemide		60	4.57	4.5	0.1	27.5	0.6	nC	2.3	−0.7	3.5 & 10.6	0.01	
Hydrochlorothiazide		70	2.74	2.7	0.5	31.0	0.1	nC	−0.1	−0.1	7.9	1.0	
Trimethoprim (AT)		97	6.61	7.7	83.0 (HP)	45.5	5.0	nC	0.9	0.7	7.1	0.4	

nC = non classified <sup>1</sup> Yamashita et al., 2000 [20] and Zhu et al., 2002 [39]; <sup>2</sup> Corti and co-workers, 2006 [5]; <sup>3</sup> Di Cagno et al. [22]; <sup>4</sup> Lindenberg et al. 2004 [38]; <sup>5</sup> Kasim et al., 2004 [28] (AT) actively transported drugs. (HP) high permeability drug [38]—Data not available for non-sink calculations.

# BIOEXENCIÓN: SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA

## ➤ Permeabilidad:

- Artículos de revistas indexadas

Research Article

### Classification of Drug Permeability with a Caco-2 Cell Monolayer Assay

Donna A. Volpe, Patrick J. Faustino, Anthony B. Ciavarella, Ebenezer B. Asafu-Adjaye, Christopher D. Ellison, Lawrence X. Yu & ...show all  
Pages 39-47 | Published online: 10 Oct 2008

Cite this article <https://doi.org/10.1080/10601330701273669>

Full Article

Figures & data

References

Citations

Metrics

Reprints & Permissions

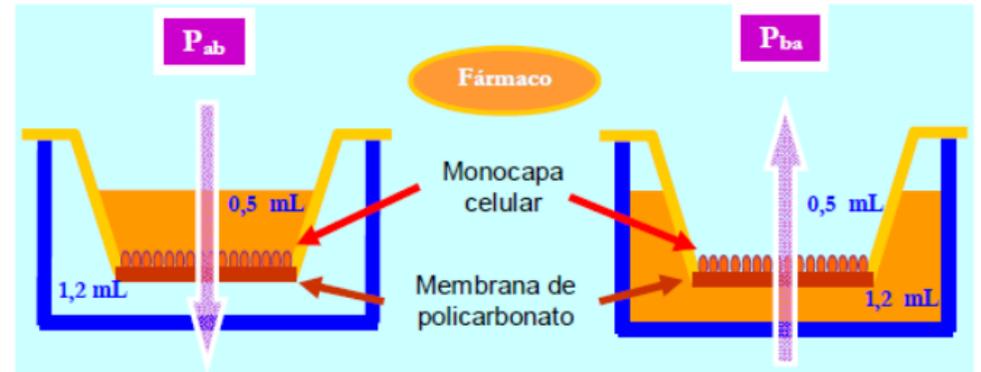
Read this article

#### Abstract

In the absence of an optimized and validated protocol for the Caco-2 cell drug permeability assay, a more general approach is considered to standardize a method within a laboratory. An assay was evaluated using over 20 model drugs to assess its ability to classify drugs as high or low permeability. This cell culture method is considered to be useful as it established a relationship between experimental permeability values and extent of absorption. This represents an application of regulatory specifications to demonstrate that a cell model is able to determine the permeability class of a drug substance.

#### Notes

[6] Center for Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration. Guidance for Industry. "Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System," 2000.



# Permeabilidad



Computacional

cLogP

mLogP



Fisicoquímicos

Coefficiente de Partición



Cultivos Celulares

Caco-2

HT-29



Tejidos

Células  
Vesículas de membranas  
Pliegues aislados



In situ

Perfusión in situ

Intestino perfundido vascular



Humano

Loc-I-Gut

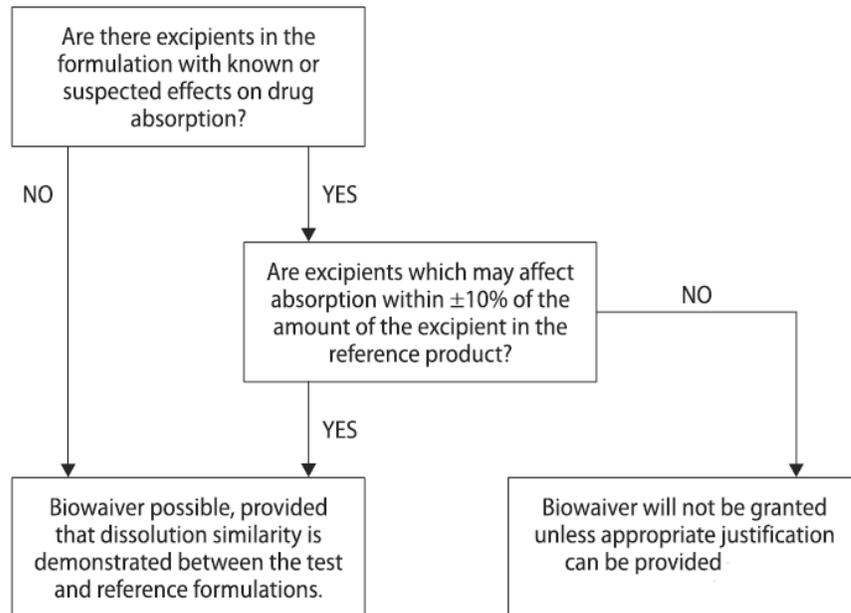
Biodisponibilidad

# BIOEXENCIÓN: SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA

## ➤ Excipientes:

### Clase I

Biopharmaceutics Classification System class I active pharmaceutical ingredients



Se permiten diferencias cuali-cuantitativa de excipientes, exceptos para excipientes que podrían afectar la absorción, estos deben ser cualitativamente los mismos y cuantitativamente similares ( $\pm 10\%$  de la cantidad en el MR). La diferencia acumulativa no debe ser más de 10%

Excipientes críticos: **Alcoholes azucarados como Manitol y Sorbitol y surfactantes como el Laurilsulfato de sodio**



\*Who Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Fifty-seventh Report. 2024.

\*ICH Harmonised Guideline. Biopharmaceutical Classification System-Based Biowaivers M9. 2020.

# BIOEXENCIÓN: SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA

## ➤ Excipientes: Clase I

ICH M9 Guideline

### EXAMPLES OF ACCEPTABLE DIFFERENCES IN EXCIPIENTS

#### **Example 1: BCS Class I biowaiver**

The formulation of the test product is qualitatively the same as that of the reference product. Additionally, it contains sorbitol, an excipient with known or suspected effects on drug absorption. The amount of sorbitol in the test formulation is within the permitted range of 45 mg to 55 mg based on the amount of sorbitol in the reference formulation (i.e., 50 mg  $\pm$  10%).

Component	Amount (mg) reference	Amount (mg) test
Drug substance	100	100
Microcrystalline cellulose (filler)	100	95
Sorbitol (filler)	50	55
HPMC (binder)	10	10
Talc (glidant)	5	5
Total	265	265



\*Who Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Fifty-seventh Report. 2024.

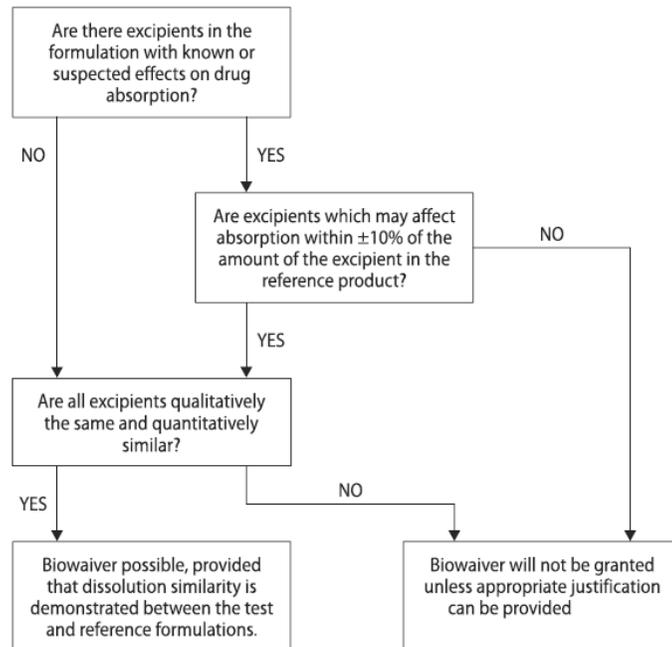
\*ICH Harmonised Guideline. Biopharmaceutical Classification System-Based Biowaivers M9. 2020.

# BIOEXENCIÓN: SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA

## ➤ Excipientes:

### Clase III

Biopharmaceuticals Classification System class III active pharmaceutical ingredients



Los excipientes deben ser cualitativamente los mismos y cuantitativamente similares (excepto para el recubrimiento de las tabletas o el sellado de las cápsulas). Para excipientes que podrían afectar la absorción, estos deben ser cualitativamente los mismos y cuantitativamente similares ( $\pm 10\%$  de la cantidad en el MR). La diferencia acumulativa no debe ser más de 10%

Excipientes críticos: **Alcoholes azucarados como Manitol y Sorbitol y surfactantes como el Laurilsulfato de sodio**



\*Who Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Fifty-seventh Report. 2024.

\*ICH Harmonised Guideline. Biopharmaceutical Classification System-Based Biowaivers M9. 2020.

# BIOEXENCIÓN: SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA

## ➤ Excipientes:

### Clase III

ICH M9 Guideline

#### Class III drugs.

Within the context of quantitative similarity, differences in excipients for drug products containing BCS Class III drugs should not exceed the following targets:	
Excipient class	Percent of the amount of excipient in the reference
<b>Excipients which may affect absorption</b>	
Per excipient:	10%
Sum of differences:	10%
	Percent difference relative to core weight* (w/w)
<b>All excipients:</b>	
<b>Filler</b>	10%
<b>Disintegrant</b>	
Starch	6%
Other	2%
<b>Binder</b>	1%
<b>Lubricant</b>	
Stearates	0.5%
Other	2%
<b>Glidant</b>	
Talc	2%
Other	0.2%
<b>Total % change permitted for all excipients (including excipients which may affect absorption):</b>	<b>10%</b>

\*Note: Core does not include tablet film coat or capsule shell

#### Example 2. BCS class III biowaiver

The test formulation is qualitatively the same as the comparator formulation. Additionally, it contains sorbitol, an excipient with known or suspected effects on API absorption. The amount of sorbitol in the test formulation is within the permitted range of 9 mg to 11 mg based on the amount of sorbitol in the comparator formulation (that is, 10 mg  $\pm$  10%). Any differences in the amount of other excipients are within the criteria outlined

Component	Comparator product		Test product		Absolute % difference relative to core weights
	Composition (mg)	Proportion relative to core weight (%w/w)	Composition (mg)	Proportion relative to core weight (%w/w)	
API	100	49.3%	100	46.5%	–
Lactose monohydrate (filler)	85	41.9%	97	45.1%	3.2%
Sorbitol (filler)	10	4.9%	9	4.2%	0.7%
Croscarmellose sodium (disintegrant)	6	3.0%	7	3.3%	0.3%
Magnesium stearate (lubricant)	2	1.0%	2	0.9%	0.1%
<b>Total</b>	<b>203</b>	<b>100%</b>	<b>215</b>	<b>100%</b>	
			<b>Total change</b>		<b>4.3%</b>

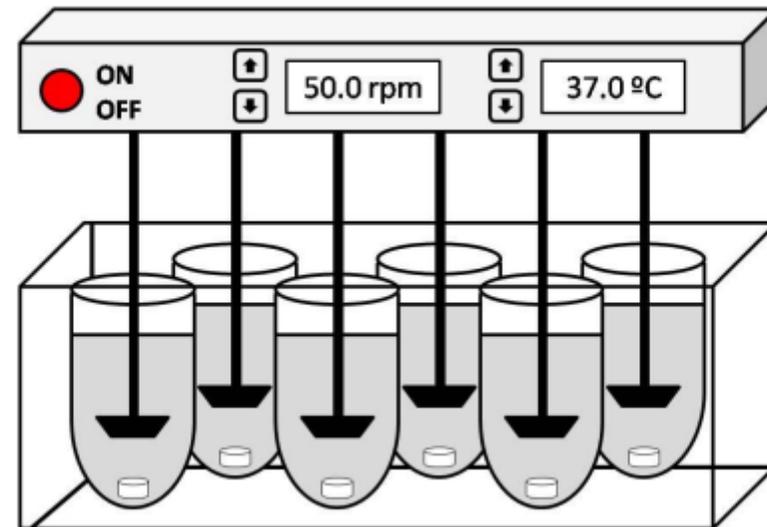


# BIOEXENCIÓN: SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA

## ➤ Disolución:

## ➤ Condiciones:

- HCl 0.1N o Fluido gástrico simulado sin enzima
- Amortiguador acetato pH 4.5
- Amortiguador fosfato pH 6.8
- Volumen 900mL o menos (500mL)
- Temperatura  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Agitación:
  - Paleta 50rpm
  - Canasta: 100rpm

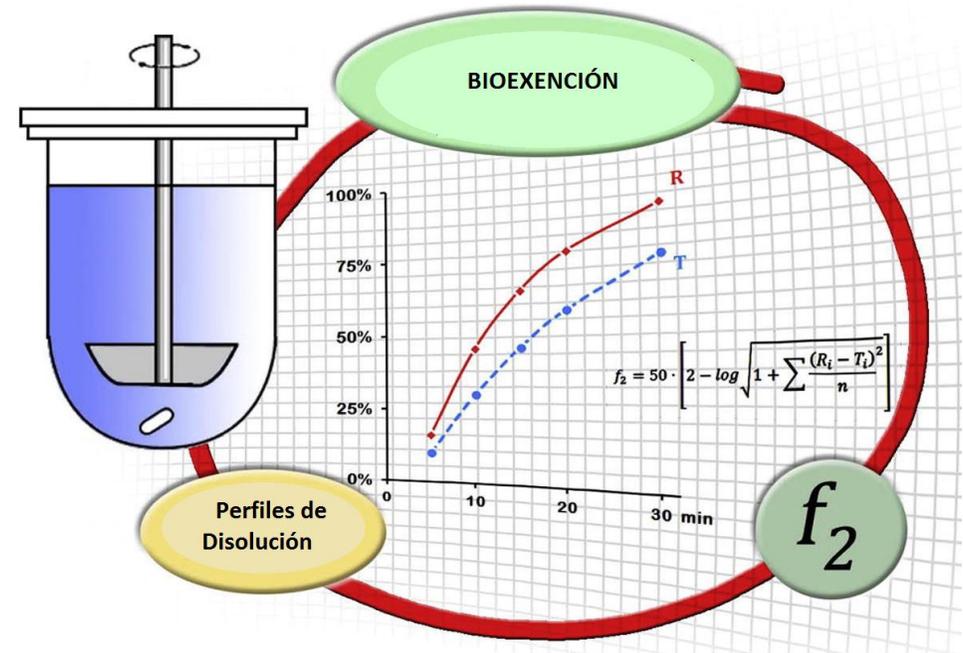


# BIOEXENCIÓN: SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA

## ➤ Disolución:

## ➤ Comparaciones: $f_2$

- n=12 unidades
- Un mínimo de tres puntos de tiempo (Se excluye el cero)
- Los puntos de tiempo deben ser los mismos
- Se utiliza los valores promedios para cada punto de tiempo y para cada producto
- No más de un valor promedio disuelto al 85% para cada producto
- El CV no debe ser más del 20% para el primer tiempo (hasta los 10 min.) y más de 10% para el resto
- Si ambos productos se disuelven más del 85% a los 15 minutos, no es necesario  $f_2$
- Tener el mismo comportamiento de disolución\*



# BIOEXENCIÓN: SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA

## ➤ Disolución:

## ➤ Comparaciones: $f_2$

- n=12 unidades
- Tres puntos de tiempo (Se excluye el cero)
- Los puntos de tiempo deben ser los mismos
- Se utiliza los valores promedios
- No más de un valor de disolución al 85%\*
- Solamente un medida debe ser considerada después del 85%\*\*
- El CV no debe ser más del 20% para el primer tiempo y más de 10% para el resto
- Si ambos productos se disuelven más del 85% a los 15 minutos, no es necesario  $f_2$

\*\*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. 2017

\*EMA. Guideline on the Investigation of Bioequivalence.2010

Valores de  $f_2$  obtenidos utilizando los criterios de la FDA y EMA

Prueba	Fármaco	$f_2$ Método 1 <sup>(a)</sup>	$f_2$ Método 2 <sup>(b)</sup>
I	Metronidazol a pH 1.2	39.22	34.80
II	Metronidazol a pH 4.5	42.79	39.88
III	Ranitidina en Agua	31.46	27.36
IV	Ranitidina a pH 4.5, Producto 1	55.18	53.65
V	Ranitidina a pH 4.5, Producto 2	30.25	24.79
VI	Ranitidina a pH 4.5, Producto 3	26.84	18.85
VII	Ranitidina a pH 4.5, Producto 4	24.61	17.93
VIII	Ranitidina HCl Producto 1	25.92	20.12
IX	Ranitidina a pH 1.2., Producto 2	24.09	17.52
X	Ranitidina a pH 1.2, Producto 3	52.10	50.14
XI	Ranitidina a pH 1.2,Producto 4	54.34	53.05
XII	Ranitidina a pH 1.2 Producto 5	25.52	20.65
XIII	Albendazol Producto 1	40.46	36.87
XIV	Albendazol Producto 2	46.19	42.31
XV	Albendazol Producto 3	64.83	65.16
XVI	Ciprofloxacino Producto 1	51.85	49.01
XVII	Ciprofloxacino Producto 2	52.15	50.97
XVIII	Ciprofloxacino Producto 3	44.54	42.74
XIX	Ciprofloxacino Producto 4	28.10	25.18
XX	Ciprofloxacino Producto 5	28.19	25.33

<sup>(a)</sup> Criterio FDA <sup>(b)</sup> Criterio EMA

# BIOEXENCIÓN: SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA

## ➤ Disolución:

## ➤ Comparaciones: $f_2$

- n=12 unidades
- Un mínimo de tres puntos de tiempo (Se excluye el cero)
- Los puntos de tiempo deben ser los mismos
- Se utiliza los valores promedios para cada punto de tiempo y para cada producto
- No más de un valor promedio disuelto al 85% para cada producto
- El CV no debe ser más del 20% para el primer tiempo (hasta los 10 min.) y más de 10% para el resto
- Si ambos productos se disuelven más del 85% a los 15 minutos, no es necesario  $f_2$
- Tener el mismo comportamiento de disolución\*

ICH. M9. Biopharmaceutics Classification System-based Biowaiver  
Adoptada por la FDA de los Estados Unidos en el 2021 y por la EMA en el 2020

Medicamento de Referencia							
N° de Muestra/Tiempo	5 minutos	10 minutos	15 minutos	20 minutos	30 minutos	45 minutos	60 minutos
1	58.55	56.25	65.45	71.13	85.73	83.65	83.89
2	41.26	62.15	78.89	68.74	81.24	86.14	85.99
3	71.56	64.58	69.89	65.23	82.01	83.72	84.75
4	45.65	60.12	72.25	89.91	79.96	84.4	84.7
5	40.82	58.98	68.45	75.67	89.96	85.67	86.36
6	64.68	78.23	66.25	71.12	95.65	90.21	85.17
7	50.13	64.25	64.24	64.21	79.56	86.07	86.46
8	75.45	62.23	65.54	78.89	95.56	91.25	95.26
9	70.25	65.24	62.23	77.24	89.96	86.22	86.83
10	55.42	61.23	71.22	69.96	78.89	86.09	86.43
11	55.78	64.24	72.15	76.54	80.23	87.26	85.72
12	76.64	64.25	70.25	74.25	83.52	83.15	83.05
Promedio	58.85	63.48	68.90	73.57	85.19	86.15	86.22
D.E	12.88	5.13	4.54	6.93	6.14	2.49	3.07
C.V. (%)	21.88	8.08	6.58	9.42	7.21	2.89	3.56

Medicamento Prueba							
N° de Muestra/Tiempo	5 minutos	10 minutos	15 minutos	20 minutos	30 minutos	45 minutos	60 minutos
1	54.45	72.24	77.64	79.39	80.08	80.14	82.08
2	50.24	65.23	73.54	74.57	74.25	77.2	78.21
3	48.83	60.14	73.18	74.8	78.25	78.14	80.18
4	50.23	60.21	77.13	88.96	83.33	84.47	87.25
5	65.68	76.24	88.34	90.58	90.27	93.79	88.32
6	77.77	66.25	94.18	96.71	91.23	96.67	92.99
7	44.21	64.23	80.24	81.12	95.23	88.89	90.12
8	66.56	61.98	94.85	90.36	90.15	92.66	90.86
9	52.26	79.24	75.6	95.65	91.25	85.24	82.26
10	64.23	66.23	82.24	80.26	95.55	89.96	96.26
11	55.25	64.59	78.53	79.96	86.26	80.21	83.19
12	86.8	70.1	88.7	87.85	85.51	87.25	86.79
Promedio	59.71	67.22	82.01	85.02	86.78	86.22	86.54
D.E	10.02	6.09	7.73	7.95	7.06	6.73	5.75
C.V. (%)	16.78	9.06	9.43	9.36	8.13	7.80	6.64



# BIOEXENCIÓN: SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA

➤ TALLER



