

Razvoj metode in vitro oslobađanja djelatne tvari

Žlabravec, Veronika

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:454385>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Veronika Žlabravec

Razvoj metode *in vitro* oslobađanja djelatne tvari

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Gordana Matijašić

Članovi povjerenstva:

Prof. dr. sc. Gordana Matijašić

Izv. prof. dr. sc. Krunoslav Žižek

Prof. dr. sc. Juraj Šipušić

Zagreb, rujan 2019.

Završni rad izrađen je u Zavodu za mehaničko i toplinsko procesno inženjerstvo Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

SAŽETAK

In vitro ispitivanje oslobađanja djelatne tvari provodi se prema definiranom postupku, propisanom od strane odgovarajućih regulatornih tijela, koji se posebno razvija za pojedinu djelatnu tvar. Ponekad je za jednu djelatnu tvar predloženo više metoda koje se razlikuju po namijenjenim medijima i/ili aparaturi.

U ovom radu ispitana je ekvivalentnost i zamjenjivost dviju *in vitro* metoda oslobađanja za djelatnu tvar celekoksib, propisanih od strane Američke agencije za hranu i lijekove (FDA). Provedena su ispitivanja oslobađanja prema USP 2 metodi u dva različita medija: 1) otopini natrijeva fosfata s natrij lauril sulfatom te 2) želučanoj tekućini s pepsinom, natrijevim hidroksidom i natrij lauril sulfatom. Uzorci su analizirani na UV/Vis spektrofotometru. Dobivene koncentracije prikazane u ovisnosti o vremenu daju profile oslobađanja koje je bilo potrebno usporediti. Sličnost profila provjerena je usporedbom na tri načina: korištenjem metoda ovisnih o modelu, metoda neovisnih o modelu te statističkim usporedbenim metodama. Oba profila zadovoljavajuće se mogu opisati Korsmeyer-Peppasovim modelom čiji izračunati parametri ukazuju na međusobnu sličnost. Vrijednosti faktora sličnosti i faktora razlike te gotovo sve vrijednosti *T*-testa i statističke analize varijance također ukazuju na sličnost profila, a time i na ekvivalentnost metoda. U desetoj i dvadesetoj minuti, međutim, nulta hipoteza o sličnosti opovrgnuta je *p*-vrijednostima manjima od 0,05. Tada je, naime, količina oslobođene tvari u mediju 2 nezanemarivo veća od one u mediju 1.

Ključne riječi: celekoksib, *in vitro* ispitivanje, Korsmeyer-Peppasov model, statističke metode

ABSTRACT

Development of *in vitro* drug release method

In vitro drug release testing is performed according to a defined procedure enjoined by appropriate regulatory authorities and specifically developed for each active substance. In some cases, multiple methods of dissolution testing that vary in used media and/or apparatus are proposed for one active substance.

This paper examines interchangeability of two FDA-recommended *in vitro* dissolution methods for the substance celecoxib. Dissolution tests were performed according to USP 2 method in two different media: 1) sodium phosphate solution with sodium lauryl sulfate and 2) simulated gastric fluid with pepsin, sodium hydroxide and sodium lauryl sulfate. Samples were analyzed using UV/Vis spectrophotometer. Dissolution profiles, shown as concentrations as a function of time, were compared. The similarity between the profiles was investigated using model-dependent, model-independent and statistical methods. Both profiles could be described adequately by the Korsmeyer-Peppas model, whose calculated parameters indicate similarity. The values of similarity and difference factors, as well as almost all values of the *T*-test and the statistical analysis of variance, also indicated the similarity of the profiles and thus the equivalence of two methods. The null hypothesis of similarity was, however, refuted at the tenth and twentieth minute by *p*-values less than 0.05. The amount of substance released in medium 2 was significantly greater than that in medium 1 at these time points.

Key words: celecoxib, *in vitro* testing, Korsmeyer-Peppas model, statistical methods

Sadržaj

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO..... | 2 |
| 2.1. Faze razvoja lijekova | 2 |
| 2.1.1. Otkrivanje..... | 2 |
| 2.1.2. Razvoj i predklinička ispitivanja | 2 |
| 2.1.3. Klinička ispitivanja | 4 |
| 2.2. <i>In vitro</i> ispitivanje oslobađanja..... | 5 |
| 2.2.1. Mehanizam oslobađanja tvari..... | 5 |
| 2.2.2. Razvoj i vrijednost testa oslobađanja | 5 |
| 2.2.3. Metode <i>in vitro</i> ispitivanja prema Europskoj farmakopeji | 7 |
| 2.3. <i>In vivo–in vitro</i> korelacije | 8 |
| 2.3.1. Razine korelacija | 8 |
| 2.3.2. Razvoj IVIVK | 9 |
| 2.3.3. Važnost IVIVK..... | 10 |
| 2.4. Modeli za opis i uspoređivanje profila oslobađanja | 10 |
| 2.4.1. Statističke metode | 11 |
| 2.4.2. Metode ovisne o modelu | 12 |
| 2.4.3. Metode neovisne o modelu..... | 15 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO..... | 16 |
| 3.1. Materijali | 16 |
| 3.1.1. Celekoksib..... | 16 |
| 3.1.2. Mediji za <i>in vitro</i> ispitivanja..... | 17 |
| 3.2. Ispitivanje oslobađanja celekoksiba..... | 17 |
| 3.2.1. Baždarni dijagrami..... | 17 |
| 3.2.2. Ispitivanje oslobađanja prema FDA metodi | 18 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA..... | 20 |
| 5. ZAKLJUČCI | 26 |
| 6. LITERATURA | 27 |

1. UVOD

Jedna od važnijih karakteristika lijeka je njegova bioraspoloživost, koja je definirana kao omjer koncentracije lijeka koji nepromijenjen dospijeva u krvotok nakon primjene bilo kojim putem i koncentracije lijeka u krvi nakon intravenske primjene. Bioraspoloživost nakon intravenske primjene jednaka je 1 (100 %), dok je za druge puteve primjene uglavnom manja od 1. To je slučaj i za oralne dozirne oblike. Naime, nakon uzimanja, pripravak mora proći kroz nekoliko „prepreka“ ne bi li se apsorbirao u krvotok i postao dostupan za namijenjeno mjesto djelovanja. Apsorpcija ovisi o otpuštanju, odnosno oslobađanju djelatne tvari iz dozirnog oblika, njegovoj topljivosti u fiziološkim uvjetima te permeabilnosti kroz membranu.

S obzirom na topljivost i permeabilnost lijekovi se svrstavaju u četiri skupine prema BCS klasifikaciji (engl. *Biopharmaceutical Classification System*): I) visoka permeabilnost i topljivost, II) visoka permeabilnost i niska topljivost, III) niska permeabilnost i visoka topljivost i IV) niska permeabilnost i topljivost. Budući da su novi lijekovi sve češće slabo topljivi i pokazuju nezadovoljavajuće karakteristike oslobađanja, provode se brojne izmjene s ciljem poboljšanja istih. Sve provedene promjene potrebno je, naravno, provjeriti i ispitati. Kako bi se izbjegla komplicirana i nepotrebna ispitivanja na ljudima, posljednjih desetljeća masovno se razvijaju *in vitro* ispitivanja oslobađanja pomoću kojih se mogu dobiti jednako vrijedni rezultati, ukoliko je metoda kojom se ispituje kvalitetna. *In vitro* podaci potom se koreliraju s *in vivo* ponašanjem.^[1,2]

Tako je u ovom radu cilj bio ispitati kvalitetu, odnosno funkcionalnu zamjenjivost dviju metoda predloženih po FDA (engl. Food and Drug Administration) za *in vitro* ispitivanje oslobađanja celekoksiba.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Faze razvoja lijekova

2.1.1. Otkrivanje

Početni cilj, pri samom otkrivanju lijeka za specifičnu bolest, je razumjeti mehanizme bolesti odnosno identificirati sudionike i puteve koji uzrokuju razvoj i/ili napredak bolesti te tako definirati potencijalne tzv. mete (ljudskog ili neljudskog podrijetla) na koje će se moći vezati molekula s pozitivnim djelovanjem. Sljedeći korak je pronaći upravo takvu molekulu koja će se vezati na metu na željen način. Tražena molekula može biti mala kemijska tvar ili velika biološka molekula te upravo o tome ovisi način potrage koja će se provoditi. Nakon dobivenih rezultata potrebno je suziti izbor na molekule koje, osim što se vežu na metu, pokazuju ljekovita svojstva te su općenito pogodnih karakteristika za daljnji razvoj. ^[1-5]

2.1.2. Razvoj i predklinička ispitivanja

Razvoj farmaceutskih dozirnih oblika, ukratko, podrazumijeva predformulacijska ispitivanja, razvoj i validaciju analitičkih metoda, dizajn, razvoj, uvećanje i optimizaciju formulacija i proizvodnog procesa, ispitivanje raznih stabilnosti i *in vivo* bioraspoloživosti. Ispitivanja se kombiniraju, međusobno isprepliću i nadopunjavaju, a nova se saznanja konstantno prenose s jednog područja u drugo u svrhu daljnjih poboljšanja. U nekoliko koraka razvoja pojavljuje se tzv. probir (engl. *High-Throughput Screening, HTS*), vrsta tehnologije kojoj je cilj u kratkom vremenu ispitati tražena svojstva (bilo djelatne ili pomoćnih tvari) velikom broju kandidata kako bi se pronašli oni koji imaju najveći potencijal za nastavak razvoja.

Najčešće odabirano agregacijsko stanje djelatne tvari (engl. *Active Pharmaceutical Ingredient, API*) je čvrsto stanje zbog sposobnosti kristaliziranja, a time i mogućnosti pročišćivanja, jednostavnijeg rukovanja i veće kemijske stabilnosti u odnosu na kapljevine. Na temelju unutrašnje strukture, čvrste tvari se mogu podijeliti u tri skupine: amorfne tvari, tekuće kristale i kristalne tvari. Čisti kristali mogu formirati soli, solvate (hidrate) ili kokristale. Upravo se mijenjanjem i pronalaskom optimalne strukture čvrste tvari može manipulirati svojstvima koja utječu na krajnju kvalitetu, svojstva i proizvodnju lijeka. Idealna forma za daljnje razvijanje je jednofazan, kristalni oblik koji nije higroskopian, posjeduje izvrsnu termičku, fizikalnu i kemijsku stabilnost, može se kontinuirano i reproducibilno proizvoditi u velikim količinama s visokim stupnjem iskorištenja i čistoće. U tu svrhu, prije no što se počne s razvojem formulacije, provode se tzv. predformulacijska ispitivanja koja će kao predznanje, osim pri odabiru optimalne strukture API-ja, poslužiti i u kasnijem dizajnu i razvoju cjelovitog dozirnog oblika, kako za predklinička tako i za klinička ispitivanja. Predformulacijska ispitivanja uključuju: karakterizaciju, odnosno određivanja fizikalno-kemijskih svojstava API-ja, određivanje konstante disocijacije, koeficijenta raspodjele, veličine i morfologije čestica, kristaliničnosti, termalnu analizu, ispitivanje topljivosti u organskim i farmaceutskim otapalima, ispitivanje kompatibilnosti s pomoćnim tvarima, namjerno izlaganje API-ja ekstremnim uvjetima s ciljem utvrđivanja promjene svojstava i slično. Optimiziraju se i relevantne analitičke metode koje će

se koristiti i u kasnijim fazama razvoja. Najviše obećavajućim kandidatima će se, nadalje, poboljšavati specifičnost i moć djelovanja, kemijska i metabolička stabilnost, topljivost te ostala farmakološka svojstva.

Bioraspoloživost lijeka uvelike ovisi o njegovoj topljivosti pa je stoga to njegovo fizikalno-kemijsko svojstvo jedno od najvažnijih koje je nužno odrediti u počecima razvoja te onda po potrebi modificirati. Na primjer, bioraspoloživost lijekova za oralnu primjenu, kao krajnjeg proizvoda, ovisi, između ostalog, o oslobađanju i otapanju djelatne tvari u probavnom sustavu. Ukoliko je API lipofilna molekula slabo topljiva u vodenom mediju, njegova apsorpcija će biti ograničena, odnosno lijek će imati malu bioraspoloživost. Iz tog razloga provode se preliminarna istraživanja oslobađanja i otapanja u biorelevantnim medijima, odnosno u uvjetima koji simuliraju one u probavnom sustavu čovjeka (ili životinje).

U fazi probira formulacija, ispituju se i međusobno uspoređuju različiti koncepti dostave lijeka: enteralno, parenteralno, lokalno, a svaki od njih ima podtipove. Optimalan koncept izabire se obzirom na stabilnost, djelotvornost i izvedivost formulacije. Ovisno o odabranom putu dostave lijeka, API se može stabilizirati, može mu se povećati bioraspoloživost ili modificirati profil oslobađanja raznim načinima pripravljanja: stvaranjem otopina, mikrosuspenzija, nanosuspenzija, sušenjem raspršivanjem, suhim granuliranjem, komprimiranjem itd. Ovisno o pripravku, koriste se različite analitičke tehnike za karakterizaciju formulacije i ispitivanje stabilnosti. To uključuje utvrđivanje ujednačenosti komponenata, pH vrijednosti, gustoće, *in vitro* oslobađanja, raspodjele veličina čestica, fizikalnih svojstava, udjela vlage.

Slijedi niz djelovanja u smislu poboljšanja ukupne upotrebljivosti lijeka, uključujući i dodavanje pomoćnih tvari. Budući da su novi kandidati sve češće slabo topljive tvari s malom bioraspoloživosti, formulatori će morati upotrijebiti niz latentnih otapala, površinski aktivnih i drugih pomoćnih tvari kako bi se topljivost i otpor precipitaciji povećali te se tako postigao željeni *in vivo* profil. Potrebno je formirati prototip s pomoćnim tvarima za koje se smatralo da su svrsishodne i provesti *in vitro* karakterizaciju kako bi se ustanovile moguće fizikalne i/ili kemijske promjene stabilnosti. Na red zatim dolazi prvo farmakokinetičko (FK) i ispitivanje bioraspoloživosti na životinjama.

Na životinjama se provode ispitivanja koja, osim farmakokinetike, podrazumijevaju i testiranje djelotvornosti i sigurnosti. Rana ispitivanja djelotvornosti (ispitivanje farmakodinamike i rasporeda doziranja) provode se na miševima i štakorima, a ispitivanja sigurnosti (pronalazak korisnog a sigurnog raspona doza i najveće podnošljive doze) uz spomenute glodavce, provode se i na ostalim vrstama. Općenito, faza u kojoj se nalazi ispitivana tvar, uz raspoloživu količinu vremena i dotad prikupljeno znanje, način doziranja, trajanje ispitivanja, testne vrste, put primjene i raspon doza imaju značajnu ulogu u razvoju trenutnog dozirnog oblika.

Za posljednja 1-3 kandidata provode se ispitivanja toksičnosti, odnosno procjenjuju rizici povezani uz kratkotrajno i dugotrajno izlaganje gotovom proizvodu. To uključuje ispitivanje kancerogenosti, imunitoksičnosti, fototoksičnosti, reproduktivne i razvojne toksičnosti, genotoksičnost i lokalne tolerancije.

Za svaku daljnju promjenu pomoćnih tvari, treba imati na umu da uz njihova pozitivna svojstva, postoji mogućnost promjene farmakokinetike, djelotvornosti i toksičnosti te je navedeno potrebno ponovno ispitati u *in vitro* ili *in vivo* modelima.

Nakon što je konačno razvijen učinkovit, a siguran lijek, te je to potvrđeno od strane odgovarajućih regulatornih tijela, moguće je započeti s ispitivanjem na ljudima.

Generički lijekovi, za razliku od originalnih, ne slijede identičan, prethodno opisan, put razvoja. Za njih postoji mogućnost odbacivanja dijelova predkliničkih i kliničkih ispitivanja, ukoliko je razvijena važeća *in vitro* metoda koja vrlo dobro oponaša *in vivo* uvjete [*in vitro*–*in vivo* korelacija (IVIVK); detaljnije opisana u 2.3.].^[1-5]

2.1.3. Klinička ispitivanja

Primarna zadaća kliničkih ispitivanja je dokazivanje sigurnosti i učinkovitosti novog ljekovitog entiteta. Dijelovi ispitivanja opisanih u 2.1.2., nerijetko se provode i za vrijeme početnih kliničkih ispitivanja. Ključ za uspješno provođenje kliničkih ispitivanja je, zato, međusobna komunikacija i razmjena znanja između svih uključenih u projekt: zaduženih za otkrivanje i razvoj, kontrolu i osiguranje kvalitete, regulatornog i medicinskog osoblja, kliničkih istražitelja te proizvođača materijala za klinička ispitivanja.

Ispitivanja se mogu podijeliti u četiri faze:^[1-5]

Faza I: Provode se početna ispitivanja sa svrhom određivanja sigurnosti i FK lijeka te nuspojava povezanih s povećanjem doze u zdravim dobrovoljcima. Ponekad se sakupljaju i preliminarni dokazi djelotvornost. Budući da često još nisu dovršena formulacijska ispitivanja, koriste se jednostavniji pripravci, tipično kapsule.

Faza II: Ispituje se učinkovitost lijeka za određenu bolest, njene znakove ili simptome u pacijentima te pojava uobičajenih kratkoročnih nuspojava i utvrđivanje rizika povezanih s doziranjem.

Faza III: Provode se proširene studije (velik broj pacijenata-ispitanika) nakon preliminarnih ispitivanja sigurnosti i učinkovitosti. Cilj je sakupiti dodatne informacije za procjenu cjelokupnog odnosa koristi i rizika povezanih uz korištenje lijeka. Formulacija koja se u ovoj fazi ispituje je ona koju se kani prodavati. Po završetku ove faze, lijek se može predati Agenciji za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration, FDA*) na evaluaciju i odobrenje za plasman na tržište.

Tijekom faze II ili III može se uspostaviti i IVIVK postoji li odgovarajući test oslobađanja.

Faza IV: Nakon odobrenja provode se daljnja, dugotrajnija ispitivanja kako bi se sakupile dodatne informacije o rizicima, dobiti i optimalnoj upotrebi.

2.2. *In vitro* ispitivanje oslobađanja

In vitro ispitivanje oslobađanja je općeprihvaćena analitička tehnika koja služi za opisivanje karakteristika oslobađanja djelatne farmaceutske tvari i konzistencije farmaceutskog proizvoda. Metoda oslobađanja se razvija zasebno za svaki proizvod. To uključuje primjenu različitih aparatura, brzina miješanja i medija u kojem se ispituje oslobađanje. Može se koristiti za oralne i ne-oralne (posebne) dozirne oblike. Gotovo svi čvrsti dozirni oblici moraju imati razvijen test oslobađanja. Budući da su čvrsti oralni pripravci najčešće upotrebljavana vrsta dozirnog oblika te su na njima provedena ispitivanja opisana kasnije u ovom radu, sav daljnji tekst odnosi se na njih.

Kako bi API imao terapijski učinak, bilo lokalno u probavnom sustavu ili na drugom mjestu do kojeg je došao krvotokom nakon apsorpcije, mora se najprije osloboditi iz čvrstog dozirnog oblika u probavni sok. Upravo brzinom i opsegom kojim se apsorbira iz dozirnog oblika i postaje dostupnim za reakciju, definirana je sama bioraspoloživost lijeka. ^[1,2]

Veoma korisnim u načinu klasificiranja ljekovitih tvari, a time i bioraspoloživosti lijeka, pokazao se BCS sustav koji ih svrstava u jedan od četiri razreda ovisno o njihovoj topljivosti u vodenom mediju, uzimajući u obzir i dodatne podatke dobivene ispitivanjem oslobađanja, i intestinalnoj permeabilnosti kako je navedeno u Uvodu.

2.2.1. Mehanizam oslobađanja tvari

Oslobađanje tvari iz čvrste formulacije, u teoriji se sastoji od tri stupnja: (1) odvajanje molekula od krutine, (2) solvatacija odvojenih molekula u mirujućem sloju otapala koji se nalazi uz površinu čvrste formulacije i (3) transport (difuzija) solvatiranih molekula lijeka iz mirujućeg sloja u masu otapala. Brzinama procesa upravljaju termodinamička svojstva krutine i molekularnih interakcija otapala i otopljene tvari. Oslobađanje tvari kontrolirano relativno sporim procesom difuzije, može se ubrzati miješanjem otopine jer se time, za transportiranje molekula u otopinu, uvodi dominantniji i brži, konvektivni mehanizam prijenosa.

Matematičko opisivanje samog procesa oslobađanja tvari iz čvrste formulacije nije lak zadatak jer su čestice različitih oblika i veličina i jer se površina s koje molekule odlaze mijenja u vremenu. Bez obzira na kompleksnost procesa, uz određene pretpostavke, razvijeni su prikladni modeli.

2.2.2. Razvoj i vrijednost testa oslobađanja

Proces razvoja testa oslobađanja može biti složen ili jednostavan, ovisno o tome pokazuje li lijek probleme povezane s topljivošću ili ne. Razvoj započinje upravo ispitivanjem topljivosti API-ja kroz cijeli fiziološki raspon pH vrijednosti. Time su dobivene temeljne informacije o potrebama koje treba zadovoljavati medij za ispitivanje. Ishod ispitivanja može uvelike ovisiti o mediju u kojem se provodi ispitivanje, pogotovo ako su ljekovita i/ili pomoćne tvari slabo topljive i/ili ionizirajuće. Odgovarajući medij, s optimalnom pH vrijednošću, dobiva se kombiniranjem različitih otapala, surfaktanata, enzima i sličnog. Osim zadovoljavajućih fizikalnih uvjeta, važan je i volumen medija zbog zahtjeva za stalnom nezasićenošću otopine

tijekom cijelog provođenja ispitivanja. Potrebno je osigurati i miješanje otopine te, općenito, koristiti ispravnu aparaturu (opisanu u 2.2.3) za postizanje željenih uvjeta.

Općenito, ispitivanje oslobađanja ovisi o primijenjenoj metodi. Značajno različiti, a istiniti podaci mogu se dobiti ispitivanjem istog proizvoda korištenjem različitih metoda. Metode se mogu razlikovati po svojstvima korištenog medija (volumenu, pH, ionskoj jakosti, surfaktantima, latentnim otapalima, aeraciji), aparaturi, brzinama miješanja, temperaturi, poziciji dozirnog oblika u mediju, mjestu uzorkovanja, okolišnim uvjetima. Navedene faktore morat će se stoga pažljivo mjeriti i motriti prilikom svih ispitivanja, kako bi interpretacija i primjena testa oslobađanja bili ispravni.

Oslobađanje djelatne tvari iz čvrstog dozirnog oblika, odnosno njen profil oslobađanja, osim promjenom raznih parametara samog testa oslobađanja, može se mijenjati i promjenom kvantitativnog i kvalitativnog sastava lijeka, fizikalnih svojstava aktivnih i neaktivnih komponenata te proizvodnog procesa. Na profil oslobađanja tako može utjecati: promjena svojstava praška (npr. raspodjela veličina čestica aktivnih/neaktivnih tvari), polimorfizam API-ja, gustoća zrnaca, viskoznost polimera i izvor pomoćnih tvari, primjena različitih proizvodnih procesa kao što su direktna kompresija i vlažno granuliranje, promjena uvjeta/parametara granuliranja, jačine kompresije i parametara procesa oblaganja. Neke od preinaka mogu, ali i ne moraju, uzrokovati i promjene u biološkom ponašanju i raspoloživosti lijeka.

Upravo osjetljivost i prilagodljivost testa oslobađanja korisne su karakteristike zbog kojih je isti postao važna analitička tehnika. Pažljivo odabranom metodom koja je robusna, obnovljiva i dovoljno diskriminirajuća, ispitivanjem oslobađanja, u kontroliranim uvjetima, mogu se uočiti eventualne promjene u sastavu, svojstvima materijala i proizvodnom procesu. *In vitro* ispitivanja oslobađanja tvari stoga su uvedena i koriste se u različitim fazama razvoja lijeka zbog različitih razloga. U predkliničkom razvoju, oslobađanje API-ja često se proučava u biorelevantnim uvjetima kako bi se procijenila vjerojatnost da će upravo oslobađanje biti najsporiji proces i pritom ograničavajući faktor u apsorpciji lijeka. Razvoj testa oslobađanja posebno je važan za daljnja ispitivanja takvih lijekova za koje je to slučaj (svrstane u razred II po BCS-u: visoko permeabilni i slabo topljivi). Kasnije se uspoređuju različite formulacije (također u biorelevantnim uvjetima) kako bi se utvrdilo koji su najbolji kandidati za klinička ispitivanja. Kako napreduju *faze II i III* kliničkih ispitivanja, povećava se količina proizvedenog lijeka te se formulacija optimizira. Poželjno je razviti i *in vitro–in vivo* korelaciju (IVIVK) tako da se biofarmaceutska svojstva nakon daljnjeg uvećanja procesa i eventualnih manjih promjena u formulacijama ili doziranju (engl. *scale-up and post-approval changes*, SUPAC) mogu vrlo jednostavno ispitivati u *in vitro* uvjetima umjesto u zahtjevnijim farmakokinetičkim ispitivanjima bioekvivalencije. Također se može procijeniti sličnost u ponašanju lijekova razreda I po BCS-u (vrlo topljivi i permeabilni, brzo otpuštajući) različitih proizvođača, gdje loši rezultati upozoravaju na bionejednakost. Nadalje, budući da se ispitivani uzorci mogu vrlo jednostavno uspoređivati s referentnim za kojeg je poznat i odobren profil oslobađanja, razvijaju se i testovi oslobađanja za provjeru dosljednosti kvalitete različitih šarža u rutinskoj proizvodnji lijeka. Kontrola kvalitete podrazumijeva potvrdu čistoće, potentnosti, deklarirane količine lijeka te uniformiranosti karakteristika oslobađanja. Postoje raznovrsne metode kojima

se provode usporedbe profila oslobađanja te su popisane, a neke i detaljnije objašnjene, u poglavlju 2.4.

2.2.3. Metode *in vitro* ispitivanja prema Europskoj farmakopeji

Za provođenje *in vitro* ispitivanja oslobađanja djelatne tvari iz oralnih dozirnih oblika mogu se koristiti razne metode čija su obilježja definirana i sistematizirana, između ostalih, i u Europskoj farmakopeji. [6] Glavna obilježja metoda su primjena prikladne naprave i načina pokretanja pripravka, primjena medija pogodnog sastava i volumena, kontinuiranost/diskontinuiranost određivanja sadržaja, prikladni vremenski raspon ispitivanja te odgovarajuća temperatura.


Po Europskoj farmakopeji procedure, mediji i vremena provođenja ispitivanja raščlanjena su za naprave 1 i 2, napravu 3 i napravu 4 obzirom na način oslobađanja ljekovite tvari iz dozirnog oblika: za dozirne oblike s konvencionalnim, produženim i odgođenim oslobađanjem.




Tablica 1. Najčešće korišteni mediji za *in vitro* ispitivanje oslobađanja ljekovite tvari iz čvrstih dozirnih oblika

| MEDIJ | pH |
|-----------------------------|-------------------|
| HCl | 1,0 |
| HCl-NaCl | 1,2 ili 1,5 |
| Fosfatni ili acetatni pufer | 4,5 ili 5,5 i 5,8 |
| Fosfatni pufer | 6,8 ili 7,2 i 7,5 |

Tako na primjer, vrijeme provođenja ispitivanja za brzo otpuštajuće dozirne oblike je 15 do 30 minuta uz konstantan interval uzorkovanja, a za pripravke s produženim učinkom može se mjeriti u satima ili čak danima, uz najprije kraće, a zatim sve dulje intervale uzorkovanja. Najčešće korišteni mediji s odgovarajućim pH vrijednostima navedeni su u tablici 1, a naprave sa specifikacijama u tablici 2. U svim slučajevima mora se održavati temperatura od $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ što odgovara prosječnoj tjelesnoj temperaturi.

Tablica 2. Naprave, i njihove bitnije specifikacije, za *in vitro* ispitivanje oslobađanja ljekovite tvari iz čvrstih dozirnih oblika

| NAPRAVA | PRIKAZ | SPECIFIKACIJE |
|----------------------------|---|--|
| naprava 1 (s košaricom) |  | cilindrična posuda od stakla (ili drugog inertnog prozirnog materijala) sa zaobljenim dnom kapaciteta 1 L, visine 160-210 mm, unutrašnjeg promjera 98-106 mm i po potrebi poklopcem, motor, pogonsko vratilo i miješalo s košaricom od nehrđajućeg čelika, vodena kupelj, visina košarice od dna 25 ± 2 mm |

| | | |
|--|---|--|
| naprava 2 (s lopaticom) |  | cilindrična posuda poput one opisane za napravu 1, motor, pogonsko vratilo i miješalo s lopaticom od inertnog materijala (ili metala i inertnog premaza), vodena kupelj, visina lopatice od dna 25±2 mm, mogućnost uporabe zavojnica od nereaktivnog materijala za potapanje dozirnog oblika |
| naprava 3 (s naizmjeničnim cilindrima) |  | komplet cilindričnih posuda s ravnim dnom (za medij u kojem se ispituje) unutar kojih se postavljaju manji cilindri (za ispitivanu tvar) s mrežicama (na vrhu i dnu) od neapsorbirajućeg i nereaktivnog materijala, kapica za isparavanje, motor, pogonski sklop za uranjanje, vodena kupelj |
| naprava 4 (s protočnom ćelijom) |  | spremnik i pumpa (240-960 mL/h) za medij, protočna komora promjera 12 ili 22,6 mm od prozirnog i inertnog materijala s filter sustavom na vrhu te često staklenim zrcima u donjem dijelu, vodena kupelj |

2.3 . *In vivo*–*in vitro* korelacije

U svrhu optimizacije lijeka provode se promjene u sastavu formulacije, proizvodnom procesu, opremi i slično. Nakon bilo koje od ovih promjena, vrlo vjerojatno će se morati provesti ispitivanja na ljudima kako bi se dokazalo da je nova formulacija bioekvivalentna sa starom. Budući da to predstavlja dodatni trošak i odgađa plasman na tržište, bilo bi poželjno razviti jednostavnije i ekonomičnije *in vitro* testove koji će odražavati podatke o bioraspoloživosti. Kako bi *in vitro* testovi bili pouzdani i jednako dobro predskazivali bioekvivalentnost, *in vitro* uvjeti moraju što je bolje moguće oponašati *in vivo* događanja. Točnije, mora postojati korelacija između *in vitro* i *in vivo* podataka. Iz tog razloga, FDA je razvila regulatorne vodiče za uspostavljanje korelacija za dozirne oblike s trenutnim i s modificiranim ili produženim oslobađanjem. [2, 7- 9]

2.3.1. Razine korelacija

Prema definiciji FDA, *in vitro*–*in vivo* korelacija (IVIVK) je matematički model koji opisuje odnos između *in vitro* obilježja dozirnog oblika (najčešće brzine ili opsega oslobađanja) i relevantnog *in vivo* odziva (npr. koncentracija lijeka u plazmi). Postoje tri općeprihvaćene tzv. razine korelacija koje se razlikuju po vrijednosti i upotrebljivosti. Razina korelacije predstavlja sposobnost odražavanja čitavog profila količine lijeka u plazmi u vremenu, ostvarenim nakon administracije dozirnog oblika. Tako postoje:

1. Razina A

Općenito, svrha razine A je definirati direktnu vezu s *in vivo* podacima tako da je *in vitro* ispitivanje oslobađanja dostatno za određivanje brzina oslobađanja promijenjenih

dozirnih oblika. Povezuju se sve točke profila dobivenog *in vitro* oslobađanjem i *in vivo* odziva u vremenu. *In vivo* odziv najčešće predstavlja izmjerena koncentracija lijeka u plazmi u vremenu i može se pomoću dekonvulcijskih metoda pretvoriti u *in vivo* profil oslobađanja i zatim usporediti s *in vitro* profilom. Najčešće spominjane metode ovisne o modelu su Wagner-Nelsonova i Loo-Riegelmanova, te numerička dekonvulcija koja ne ovisi o modelu. Može se koristiti i konvulcijski pristup gdje se dobiveni *in vitro* profil oslobađanja pretvara u očekivane koncentracije postignute u plazmi u vremenu te zatim uspoređuje sa stvarnim *in vivo* koncentracijama. Nakon potvrđivanja ove razine korelacije, odobrenja svih manjih ili većih promjena koje se tiču proizvodnog procesa mogu se postići korištenjem *in vitro* ispitivanja jer krivulja dobivena *in vitro* ispitivanjem oslobađanja sada služi kao surogat za *in vivo* ponašanje.

2. Razina B

Srednje vrijeme *in vitro* oslobađanja proizvoda uspoređuje se ili sa srednjim vremenom *in vivo* zadržavanja ili srednjim vremenom *in vivo* oslobađanja. Razne *in vivo* krivulje mogu imati slične vrijednosti vremena zadržavanja i korelacija B razine ne odražava stvarne krivulje *in vivo* razine u plazmi. Ne može se samostalno koristiti za odobravanje nakon ranije navedenih promjena.

3. Razina C

Ne odražava cijeli oblik krivulje koncentracije u plazmi jer se jedna točka vremena oslobađanja ($t_{50\%}$, $t_{90\%}$ i slično) uspoređuje s jednim srednjim farmakokinetičkim parametrom kao što su površina ispod krivulje „koncentracija u plazmi-vrijeme“ (engl. *area under the curve*, AUC), c_{\max} ili t_{\max} – najveća postignuta koncentracija u plazmi odnosno vrijeme u kojem je postignuta. Može bit korisna u ranoj fazi razvoja formulacije.

4. Višestruka razina C

Povezuje jedan ili nekoliko farmakokinetičkih parametara s količinom otopljenog lijeka u određenim vremenskim točkama. Može se koristiti za opravdavanje odbacivanja biostudija ukoliko je korelacija potvrđena za cijeli profil otapanja s jednim ili nekoliko farmakokinetičkih parametara.

2.3.2. Razvoj IVIVK

IVIVK ima smisla razvijati kada je apsorpcija lijeka ograničena luminalnim oslobađanjem/otapanjem. Ukoliko je taj uvjet zadovoljen, razvoj slijedi nekoliko faza. U početku dok još nisu razvijene formulacije, *in vitro* ponašanje, a onda posljedično i veza između *in vitro* oslobađanja i *in vivo* oslobađanja/apsorpcije, je nepoznato. Mora se, stoga, uvesti pretpostavka da će *in vitro* test točno oponašati oslobađanje *in vivo* te da će korelacija slijediti omjer 1:1. U fazi selekcije prototipova već postoje *in vitro* podaci koji se mogu unijeti u pretpostavljeni model. Tek nakon prvog FK ispitivanja, međutim, korištena simulacija može se početi smatrati pouzdanom te se može razviti korelacija. Nakon što je pronađena korelacija za koju se smatra da bi mogla biti korisna, a prije daljnje upotrebe, potrebno ju je evaluirati,

odnosno potrebno je dokazati da je predvidljivost *in vivo* učinka održana kroz cijeli opseg *in vitro* brzina oslobađanja. Ovisno o tome za što će se IVIVK upotrebljavati i na temelju terapeutskog indeksa lijeka, procjena prediktivne pogreške, na kojoj se najčešće temelji procjena korelacije, može se provesti pomoću unutarnjih i/ili vanjskih procjena. U SUPAC fazi, kad je već proizvedeno mnogo serija lijeka, definirane su kritične proizvodne varijable i poznat je normalan raspon karakteristika oslobađanja formulacije, dodatni podaci se mogu uvrstiti u početni set za razvoj IVIVK, dajući modelu tako još veću pouzdanost.

Utvrđena korelacija važeća je samo za specifični tip dozirnog oblika (tablete, želatinske kapsule itd.) s određenim mehanizmom oslobađanja i određenim glavnim pomoćnim tvarima i aditivima. Korelacija je i dalje točna te ima moć predviđanja samo ako promjene u dozirnom obliku ostanu unutar određenih granica.

2.3.3. Važnost IVIVK

Uspostavljanjem korelacije, *in vitro* ispitivanje oslobađanja postaje još važniji segment u razvoju i proizvodnji lijeka. IVIVK dopušta optimizaciju dozirnih oblika s najmanje moguće ispitivanja na ljudima jer se može koristiti kao surogat ispitivanju *in vivo* bioraspodjelivosti i bioekvivalencije kako još u razvoju lijeka, tako i za promjene povezane sa SUPAC-om. Poboľšane su i specifikacije *in vitro* oslobađanja (količina djelatne tvari oslobođena u određenom vremenu, izražena kao postotak ukupnog sadržaja navedenog na pakiranju) te je na taj način smanjena mogućnost izdavanja nekvalitetnih proizvoda. Zaključno, IVIVK vodi do skraćenja vremena razvoja lijeka, poboljšanja kvalitete proizvoda, smanjenja nepotrebnih ispitivanja na ljudima i, posljedično, potrebnih novčanih sredstava te je zbog toga dio proizvodnje lijekova kojemu se zadnjih desetljeća posvećuje sve veća pažnja.

2.4. Modeli za opis i uspoređivanje profila oslobađanja

Analiza sakupljenih podataka ovisi o tomu mjeri li se diferencijalna (u otvorenim sustavima) ili kumulativna (u zatvorenim sustavima) količina otopljene tvari. Budući da se za ispitivanja češće koriste zatvoreni sustavi te je takav korišten i za ispitivanje opisano u ovom radu, navedeni načini analize odnosit će se na kumulativne setove podataka.

Kvantitativna analiza podataka dobivenih ispitivanjem oslobađanja može se provesti korištenjem matematičkih formula koje prikazuju rezultate oslobađanja kao funkciju karakteristika dozirnog oblika. Matematički modeli ponekad se izvode iz teorijskih analiza procesa koji se odvija, no u većini slučajeva teorijski koncept ipak nije dostupan i prikladnije su empirijske jednadžbe. Oslobađanje lijeka iz čvrstih dozirnih oblika opisano je nekim od kinetičkih modela u kojima je količina oslobođenog lijeka, Q , funkcija vremena, t , tj. $Q=f(t)$. Često se koriste analitičke definicije $Q(t)$ funkcije kao što su modeli nultog ili prvog reda, Hixson-Crowellov, Weibullovo, Higuchijev, Korsmeyer-Peppasov ili Hopfenbergov model. Drugi parametri oslobađanja poput vremena oslobađanja ($t_{x\%}$), vremena ispitivanja ($t_{x\ min}$), efikasnosti oslobađanja, faktora sličnosti (f_2) i razlike (f_1) te Rescignovi indeksi (ζ_1 i ζ_2) također se mogu koristiti za karakterizaciju profila oslobađanja lijeka. Za uspoređivanje profila

oslobađanja koriste se statističke metode, metode ovisne o modelu i metode neovisne o modelu. [10, 11]

2.4.1. Statističke metode

Statističke metode procjenjuju razliku između srednjih vrijednosti dvaju setova podataka oslobađanja lijeka dobivenih iz ispitivanja s jednom (ANOVA ili t -student test) ili više točaka (MANOVA).

ANOVA (univarijantna analiza varijance)

Statistički postupak kojim se utvrđuje statistička značajnost razlika između aritmetičkih sredina dvije ili više grupa entiteta u jednoj varijabli. Moguće je postaviti nultu (H_0 ; uz pogrešku p ne može se tvrditi da su razlike između aritmetičkih sredina analiziranih grupa statistički značajne), odnosno alternativnu (H_1 ; razlike između aritmetičkih sredina analiziranih grupa statistički su značajne uz pogrešku p) hipotezu te je samo jedna od njih točna (H_0 se smatra ispravnom dok se ne dokaže suprotno):

$$H_0 : \bar{x}_1 = \bar{x}_2 = \dots = \bar{x}_k \quad (1)$$

$$H_1 : \bar{x}_1 \neq \bar{x}_2 \neq \dots \neq \bar{x}_k \quad (2)$$

Ako je varijabilnost između grupa statistički značajno veća od varijabilnosti unutar grupa onda se grupe međusobno značajno razlikuju. Varijanca između grupa (σ_{ig}^2) izračunava se prema formuli:

$$\sigma_{ig}^2 = \frac{\sum_{g=1}^k n_g (\bar{x}_g - \bar{x}_{uk})^2}{k-1} \quad (3)$$

gdje je n_g broj entiteta u grupi g ($g = 1, 2, \dots, k$), k broj grupa, \bar{x}_g aritmetička sredina grupe g , a \bar{x}_{uk} aritmetička sredina svih rezultata (zajednička aritmetička sredina). Varijanca unutar grupa (σ_{ug}^2) izračunava se prema formuli:

$$\sigma_{ug}^2 = \frac{\sum_{g=1}^k \sum_{i=1}^{n_g} n_g (x_{gi} - \bar{x}_g)^2}{n-k} \quad (4)$$

gdje je x_{gi} rezultat entiteta i pripadnika grupe g ($i = 1, 2, \dots, n_g$), a n ukupan broj entiteta.

Statistička značajnost razlika između grupa testira se putem F -raspodjele. F -vrijednost izračunava se kako omjer varijance između grupa i varijance unutar grupa:

$$F = \frac{\sigma_{ig}^2}{\sigma_{ug}^2} \quad (5)$$

Ako je izračunata F -vrijednost veća od kritične, onda su razlike između grupa statistički značajne. Kritična F -vrijednost određuje se na temelju broja stupnjeva slobode (df_1 i df_2) i pogreške statističkog zaključka p .^[12]

2.4.2. Metode ovisne o modelu

Kinetika nultog reda

Teorijski izveden model, opisuje oslobađanje djelatne tvari iz pripravaka kod kojih je oslobađanje sporo.

Opći oblik modela prikazuje jednažba:

$$Q_0 - Q_t = K_0 t \quad (6)$$

Gdje je Q_t količina lijeka otopljena u vremenu t , Q_0 početna količina lijeka u otopini, a K_0 konstanta brzine oslobađanja nultog reda izražena u jedinicama koncentracija/vrijeme.

Model se može primijeniti na oslobađanje djelatne tvari iz nekoliko vrsta pripravaka s produženim učinkom, kao i kod nekih transdermalnih sustava, matričnih tableta sa slabo topljivom djelatnom tvari, dražeja itd. Pripravci čiji profil oslobađanja djelatne tvari odgovara kinetici nultog reda oslobađaju konstantnu količinu djelatne tvari po jedinici vremena, što je idealna metoda oslobađanja za postizanje produženog učinka.

Kinetika prvog reda

Ovaj model koristi se za opis apsorpcije i/ili eliminacije nekih lijekova. Opisan je jednažbama:

$$\frac{dc}{dt} = Kc \quad (7)$$

ili u linearnom obliku:

$$\log c = \log c_0 - \frac{Kt}{2,303} \quad (8)$$

gdje je K konstanta brzine oslobađanja prvog reda, c_0 početna koncentracija djelatne tvari, a t vrijeme.

Ovaj odnos može se koristiti za opis oslobađanja lijeka iz pripravaka poput onih koji sadrže vodotopljive lijekove u poroznim matricama.

Weibullov model

Weibullov model je izveden empirijski, može se koristiti za opis različitih procesa otapanja, a koristan je i za uspoređivanje profila oslobađanja lijeka iz matrica. Izražen je jednačbom:

$$M = M_0 \left[1 - e^{-\frac{(t-T)^b}{a}} \right] \quad (9)$$

Ovdje je M količina lijeka oslobođenog u vremenu t , M_0 ukupna količina oslobođenog lijeka; a je parametar skale i opisuje vremensku ovisnost, b parametar oblika i opisuje oblik krivulje, a T lokacijski parametar koji predstavlja vrijeme zadržske početka rasta krivulje.

Za $b > 1$, krivulja dobiva sigmoidalan oblik sa zakrivljenim vrhom; za $b < 1$ krivulja pokazuje strmi porast; za $b = 1$ krivulja poprima eksponencijalni oblik s konstantom $1/a$:

$$M = M_0 \left[1 - e^{-k(t-T)} \right] \quad (10)$$

Higuchijev model

Higuchijev model opisan je jednačbom:

$$f_t = Q = A \sqrt{D(2c - c_s) c_s t} \quad (11)$$

gdje je Q količina lijeka oslobođena u vremenu t po jedinici površine A , c je početna koncentracija lijeka, c_s je topljivost lijeka u matričnom mediju, a D koeficijent difuzije molekule lijeka u matričnom sadržaju. Izraz se temelji na nekoliko pretpostavki: $c \gg c_s$; difuzija se odvija u samo jednoj dimenziji; čestice lijeka su puno manje od debljine pripravka; zanemarivo oticanje i topljenje matrice; konstantna vrijednost D .

Model je moguće pojednostaviti kao:

$$f_t = Q = K_H \cdot t^{1/2} \quad (12)$$

gdje je K_H Higuchijeva konstanta otapanja. Higuchi ovdje opisuje oslobađanje djelatne tvari kao proces difuzije baziran na Fickovu zakonu, ovisan o korijenu vremena. Općeniti izraz može se koristiti za opis oslobađanja djelatne tvari iz različitih pripravaka s produženim učinkom, nekih transdermalnih sustava i tableta s vodotopljivim djelatnim tvarima.

Hixon-Crowellov model

Hixson i Crowell su iz činjenice da je redovna površina čestice proporcionalna trećem korijenu volumena te čestice izveli jednačbu:

$$W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = \kappa \cdot t \quad (13)$$

gdje je W_0 početna količina lijeka u pripravku, W_t preostala količina lijeka u pripravku u vremenu t , a κ konstanta ugradnje površinsko-volumnog odnosa.

Ovaj izraz može se primijeniti kod pripravaka poput tableta, gdje se oslobađanje odvija na područjima paralelnim površini lijeka, ako se dimenzije tablete proporcionalno smanjuju na način da se početni geometrijski oblik zadržava.

Korsmeyer-Peppasov model

Opisuje oslobađanje lijeka iz polimernih sustava prema jednadžbi:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n \quad (14)$$

gdje razlomak označava dio oslobođenog lijeka u vremenu t , K konstantu brzine oslobađanja, a n eksponent oslobađanja, koji se koristi za karakterizaciju različitih oslobađanja za cilindrične oblike matrica.

Hopfenbergov model

Ovaj model podrazumijeva brzinu erozije matrice kao kinetički kontrolirajući mehanizam i koristi se za opis heterogene erozije pločastih, sferičnih i cilindričnih pripravaka po jednadžbi:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left[1 - \frac{k_0 t}{c_0 a_0} \right]^n \quad (15)$$

gdje je M_t količina lijeka oslobođena u vremenu t , M_∞ ukupna količina lijeka, k_0 je konstanta brzine erozije, c_0 početna koncentracija lijeka u matrici, a a_0 početni polumjer sfere/cilindra ili polovina iznosa debljine za pločasti oblik. Vrijednost n iznosi 1, 2 i 3 za, redom, pločasti, cilindrični i sferični oblik.

Uz navedene modele, koriste se i Baker-Londdaleov, Gompertzov, model kinetike drugog reda i slično.

Kriteriji za odabir najboljeg modela

Kako bi se odredila primjenjivost modela, potrebno je procijeniti sposobnost odabranog modela za opisivanje dobivenih podataka. Za to se koriste srednje kvadratno odstupanje (R^2), korigirano srednje kvadratno odstupanje ($R^2_{korigirano}$), srednja kvadratna pogreška (engl. *mean square error*, *MSE*), korijen srednje kvadratne pogreške (engl. *root mean square error*, *RMSE*), Akaikeov informacijski kriterij (engl. *Akaike information criterion*, *AIC*), kriterij odabira modela (engl. *model selection criterion*, *MSC*) i slično.

Za usporedbu modela s jednakim brojem parametara, često se koristi srednje kvadratno odstupanje (R^2):

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}_i)^2} \quad (16)$$

Budući da je uspoređivanje modela s različitim brojem parametara ipak češće, koristi se korigirano srednje kvadratno odstupanje:

$$R_{\text{kor.}}^2 = 1 - \frac{(n-1)}{(n-p)} \cdot (1 - R^2) \quad (17)$$

gdje je n broj eksperimentalnih točaka, a p broj parametara modela.

2.4.3. Metode neovisne o modelu

Tu spadaju tzv. omjer-testovi i testovi u kojima se provodi usporedba parova podataka. Jednostavne su za korištenje, no imaju nekoliko mana (jedna od kojih je i nepostojanje znanstvene podloge). Omjer-testovi podrazumijevaju računanje omjera između dvaju postotaka oslobođenog lijeka, omjera površina ispod dviju krivulja oslobađanja, omjera srednjih vremena oslobađanja i sl. Usporedba parova podataka uključuje, pak, Rescignov indeks te Moore-Flannerove indekse, odnosno faktore sličnosti i razlike.

Faktor razlike (f_1) i faktor sličnosti (f_2)

Za određivanje ovih faktora, prvo se odrede profili oslobađanja referentnog (R) i ispitivanog proizvoda (T) (12 jedinica od svakog), u tri do četiri ili više vremenskih točaka. Općenito, vrijednosti f_1 do 15 % (0 – 15) i f_2 veće od 50 % (50 – 100) pokazuju ekvivalentnost između dva profila. ^[10, 11]

Računaju se po formulama:

$$f_1 = \left\{ \frac{\left[\sum_{t=1}^n (R_t - T_t) \right]}{\sum_{t=1}^n R_t} \right\} \cdot 100 \quad (18)$$

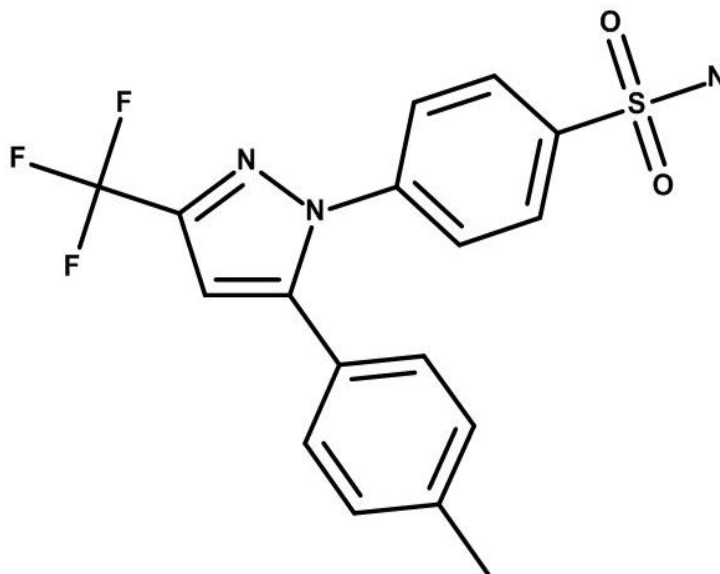
$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \cdot 100 \right\} \quad (19)$$

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Celekoksib

Celekoksib je diaril supstituirani pirazol molekulske formule $C_{17}H_{14}F_3N_3O_2S$, čija je struktura prikazana na slici 1.



Slika 1. Kemijska struktura celekoksiba

U tablici 3 navedena su neka njegova fizikalna svojstva.

Tablica 3. Fizikalna svojstva celekoksiba

| SVOJSTVO | OPIS/VRIJEDNOST |
|---|---|
| molekularna masa | 381,4 g/mol |
| topljivost | slabo topljiv; 4,3 mg/L u vodi pri 25°C |
| temperatura taljenja | 158,0°C |
| koeficijent raspodjele n-oktanol/voda (log P) | 3,47 |
| konstanta disocijacije (pK _a) | 11,1 |
| forma i boja | bijeli do gotovo bijeli prah |

Celekoksib je nesteroidni antireumatik (NSAR) i prvi selektivni inhibitor ciklooksigenaze-2 (COX-2) uveden u kliničku praksu. Ima dokazanu učinkovitost u liječenju bolesnika s osteoartritisom, reumatoidnim artritisom i ankilozantnim spondilitisom. Uzima se kao oralni pripravak, u količinama od 200 – 400 mg na dan. Dobro se apsorbira iz probavnog trakta te postiže vršnu koncentraciju u plazmi dva do tri sata nakon primjene. Iz organizma se eliminira uglavnom metabolizmom. Ima dobru podnošljivost, uz blage do umjerene tegobe probavnog trakta koje su ujedno i najčešće nuspojave. ^[13, 14]

3.1.2. Mediji za *in vitro* ispitivanja

Postupak 1

Medij 1: 0,04 M Na₃PO₄ (pH = 12) s 1 % mas. SLS; V_{uk} = 1000 mL

- U 500 mL vode otopljeno je 6,5576 g natrijevog fosfata uz miješanje.
- Uz miješanje otopiti 10,0034 g natrij lauril sulfata (SLS) u 140 mL.
- Obje otopine pomiješati u tikvici od 1000 mL i nadopuniti vodom do oznake. Provjeriti pH staklenom elektrodom.

Postupak 2

Medij 2: 750 mL želučane tekućine uključujući i pepsin (engl. *simulated gastric fluid, SGF*), 180 mL otopine SLS-a (konačni udio mora biti 1 % mas.) i 70 mL 1,2 M NaOH (pH = 12); V_{uk} = 1000 mL

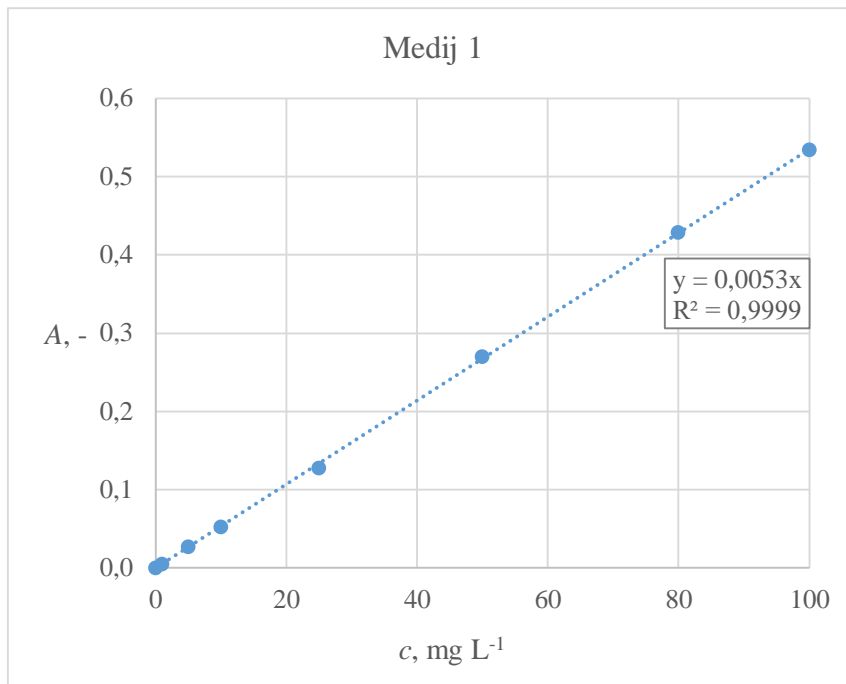
- 41,62 mL 37 %-tne otopine klorovodične kiseline razrijediti u tikvici od 500 mL do oznake kako bi se dobila 1 M otopina HCl.
- Otopiti 2 g natrijeva klorida i 3,2 g pepsina (žučkasti prah) u 500 mL destilirane vode, zatim, u tikvicu od 1000 mL, pomiješati s 80 mL 1 M otopine HCl i razrijediti vodom do oznake.
- Otopiti 10,0034 g SLS-a u 180 mL vode.
- Otopiti 11,9991 g natrijeva hidroksida (prozirno-bijele granule) u 250 mL vode kako bi se dobila 1,2 M otopina NaOH

3.2. Ispitivanje oslobađanja celekoksiba

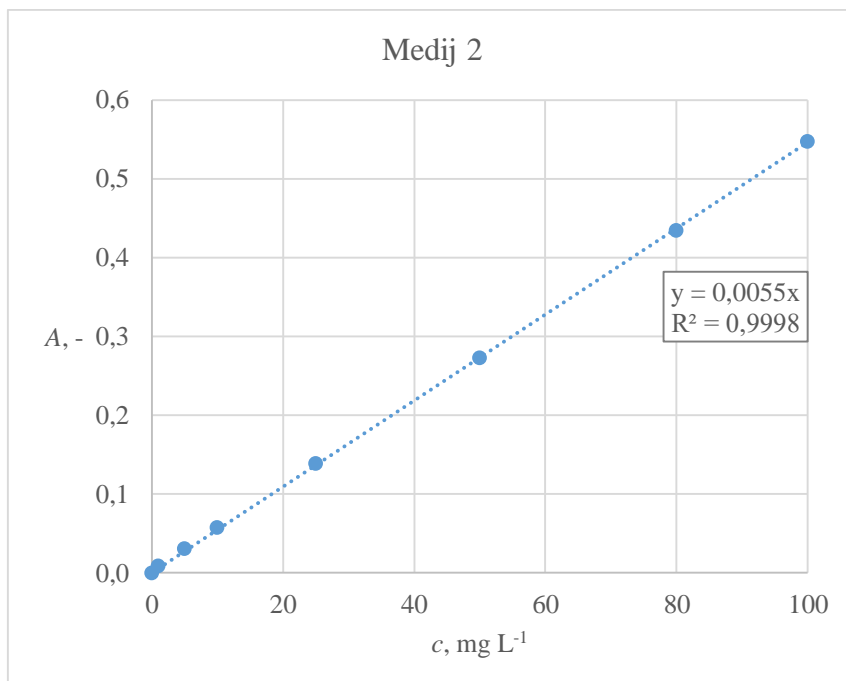
Ispitivanje oslobađanja celekoksiba provedeno je *in vitro* upotrebom različitih medija pripremljenih kako je opisano u poglavlju 3.1.2. Uzorci su uzimani u različitim vremenskim intervalima, a koncentracije su određene iz izmjerenih apsorbancija i prethodno pripremljenih baždarnih dijagrama.

3.2.1. Baždarni dijagrami

Kako bi se dobila otopina koncentracije 100 ppm, potrebno je otopiti 10 mg CLX-a u 100 mL medija navedenog u 3.1.2. Dalje se provode razrjeđenja kako bi se dobile manje koncentracije. Uzorci se analiziraju na UV/Vis spektrofotometru Shimadzu UV-1280 čije je radno područje od 190 do 1100 nm. Analizom otopina dobiveni su baždarni dijagrami u oba medija kako je prikazano na slikama 2 i 3.



Slika 2. Baždarni pravac za celekoksib u mediju 1



Slika 3. Baždarni pravac za celekoksib u mediju 2

3.2.2. Ispitivanje oslobađanja prema FDA metodi

In vitro ispitivanje oslobađanja celekoksiba provodi se na uređaju za ispitivanje oslobađanja djelatnih tvari, RC-6D, *Zhengzhou Nanbei Instrument* prema USP 2 metodi (s lopaticom). U tri želuca ulijeva se medij za ispitivanje te se temperatura podešava na $37 \pm 0,5$ °C, a broj okretaja lopatica na 50 o/min. Nakon postizanja radne temperature, u želuce se ubacuju kapsule sa 100 mg celekoksiba. Usporedba postupka 1 i postupka 2 prikazana je u tablici 4.

Tablica 4. Uvjeti *in vitro* ispitivanja

| | Postupak 1 | Postupak 2 |
|---------------------|---|--|
| USP aparat | 2 | 2 |
| Broj okretaja | 50 o/min | 50 o/min |
| Medij | Medij 1: 0,04 M Na ₃ PO ₄ s 1 % mas. SLS; | Medij 2: 750 mL želučane tekućine uključujući i pepsin, 180 mL otopine SLS-a i 70 mL 1,2 M NaOH |
| pH | 12 | 1,2 (20 min), 12 |
| Volumen | 1000 mL | 750 mL (20 min) + 250 mL |
| Vrijeme uzorkovanja | 10, 20, 30, 45 i 60 min | 10, 20, 30, 45 i 60 min |
| Valna duljina | 254,0 nm | 254,0 nm |

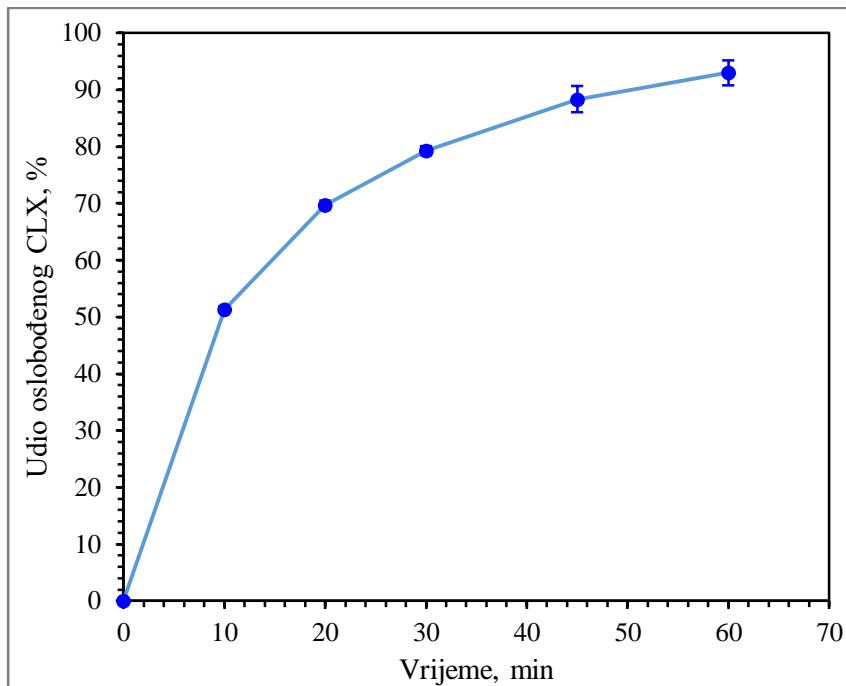
Postupak 2 izvodi se u dva koraka. Kapsule su 20 min u želučanoj tekućini (750 mL), a nakon toga se dodaje 180 mL otopine SLS-a i 70 mL 1,2 M otopine NaOH što ukupno čini 1000 mL medija.

4. REZULTATI I RASPRAVA

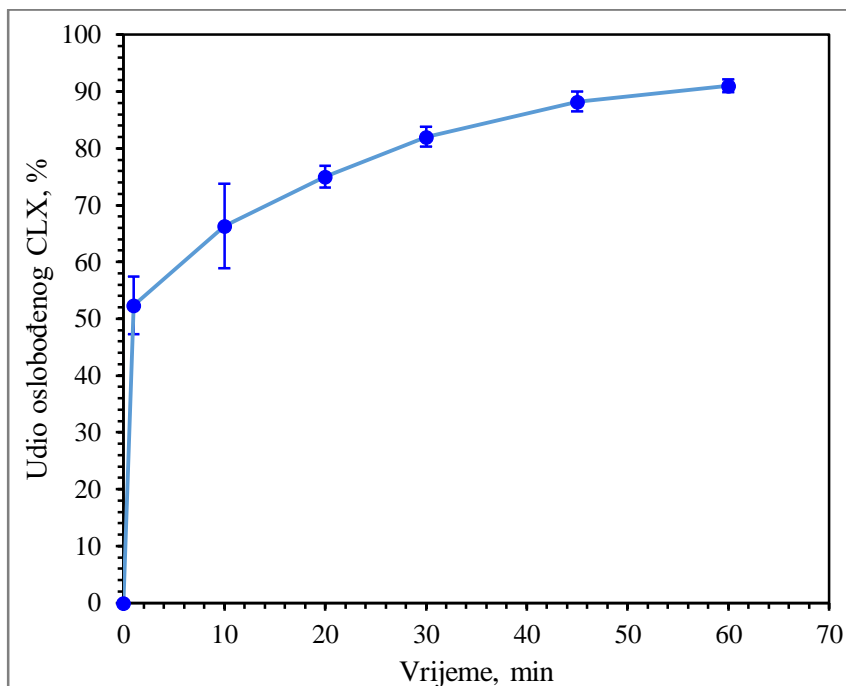
U ovom poglavlju prikazani su rezultati istraživanja. Provedena su *in vitro* ispitivanja oslobađanja celekoksiba prema dvije metode propisane od strane FDA.

Na slikama 4 i 5 prikazani su profili oslobađanja celekoksiba u mediju 1 i mediju 2 dobiveni *in vitro* ispitivanjima. Prikazane su srednje vrijednosti tri mjerenja i standardne devijacije. Koncentracije celekoksiba u vremenu izračunate su iz baždarnog pravca na temelju izmjerenih apsorbancija. Na slikama 4 i 5, profili su prikazani kao ovisnost srednjih vrijednosti udjela oslobođenog celekoksiba, dobivenih iz omjera mase tvari oslobođene u vremenu i ukupne količine tvari koja se nalazila u kapsuli ($100 \pm 1,6$ mg), u vremenu.

Profil dobiven ispitivanjem u mediju 1 (profil 1; slika 4) započinje naglim rastom do desete minute u kojoj je otpušteno nešto više od 50 % celekoksiba, a nakon toga nastavlja postepeno rasti otprilike dvostruko manjim vrijednostima dok nije dostignut kraj ispitivanja označen šezdesetom minutom u kojoj je otpušteno 93 % tvari. Profil dobiven ispitivanjem u mediju 2 (profil 2; slika 5) započinje naglim skokom do prve minute u kojoj je također otpušteno nešto više od 50 % celekoksiba te zatim dalje raste nešto manjim vrijednostima negoli profil 1 dok ne dosegne 91 % od ukupne količine. Važno je napomenuti da je nagli početni skok profila 2 uzrokovan činjenicom da se otpuštanje tvari provodilo već i prije početka uzorkovanja; 20 minuta u 750 mL simulirane želučane kiseline. Uz srednje vrijednosti, na grafovima su prikazane i odgovarajuće standardne devijacije. Niske vrijednosti standardnih devijacija ukazuju na bliskost pojedinih podataka dobivenoj srednjoj (očekivanoj) vrijednosti seta podataka, a visoke na rasipanje pojedinih podataka kroz veći raspon vrijednosti. Na slici 4 može se vidjeti da odstupanje zapravo postoji tek za zadnje dvije točke, no ono nije značajno. Na slici 5, međutim, uz manja vidljiva odstupanja postoje dva značajnija za točke 2 i 3. Uzrok tomu je nešto slabije otpuštanje celekoksiba iz kapsule "2" u prvoj trećini ispitivanja (za ~8 % i 13 % manji udio otpuštene tvari od kapsula "1" i "3"). Upravo zbog navedenih mogućih odstupanja potrebno je ponavljati više mjerenja te računati srednje vrijednosti i standardne devijacije.



Slika 4. Profil oslobađanja celekoksiba u mediju 1

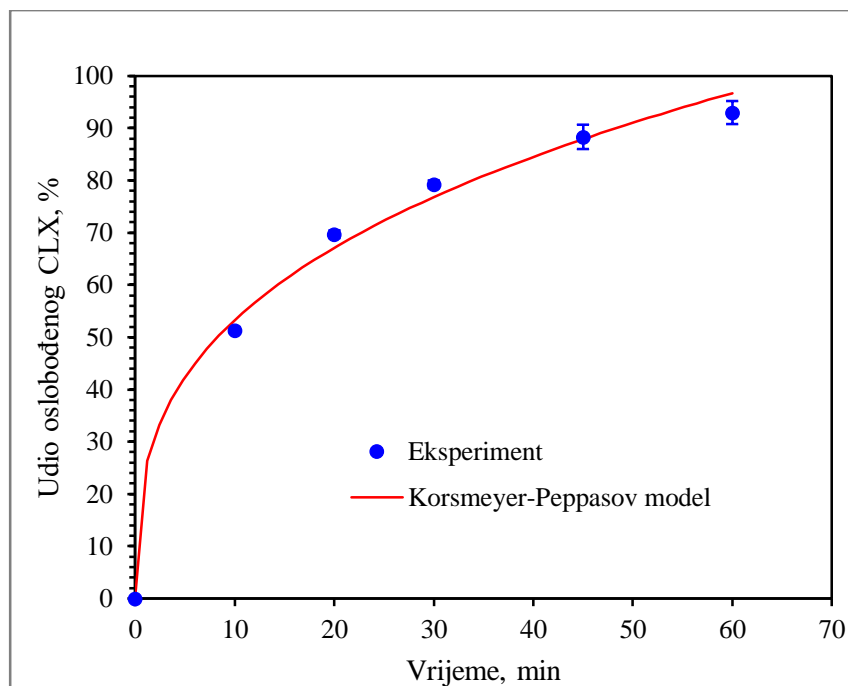


Slika 5. Profil oslobađanja celekoksiba u mediju 2

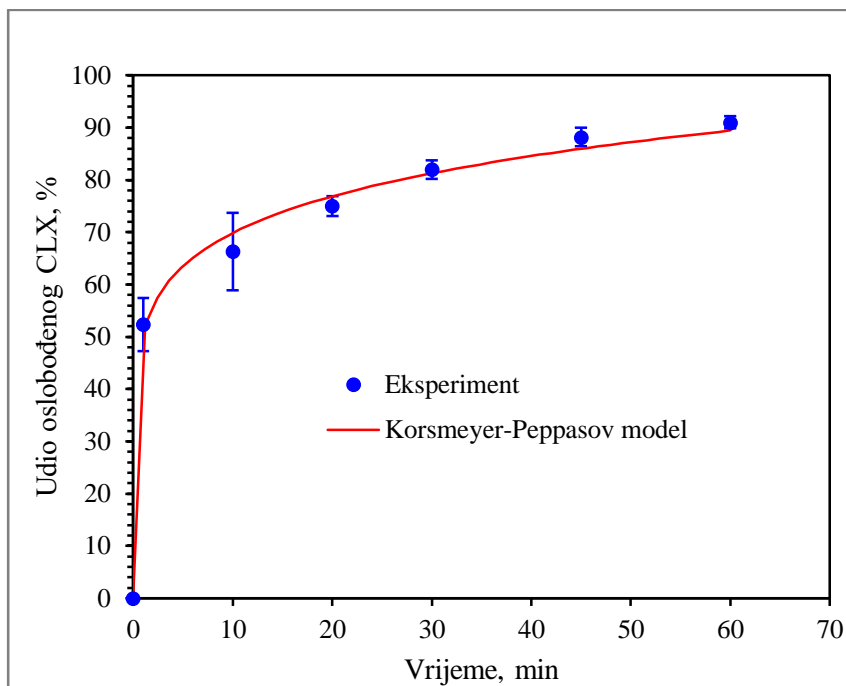
Dobiveni eksperimentalni profili opisuju se nekim kinetičkim modelom kako bi se dobile konkretne vrijednosti koje će poslužiti za usporedbu dvaju profila. Za obradu podataka korišten je DDSolver, dodatni alat Microsoft Excel-a, u kojeg su ugrađeni svi kinetički modeli inače korišteni za opisivanje profila oslobađanja djelatnih tvari. Obrada podataka tako je znatno pojednostavljena jer se vrlo brzo mogu izračunati kako parametri modela tako i brojni relevantni statistički parametri za različite modele. Za opisivanje oba profila testirani su

Weibullov i Korsmejer-Peppasov model. Analizom statističkih vrijednosti utvrđeno je da se eksperimentalni profil 2 može opisati Korsmejer-Peppasovim modelom puno preciznije nego Weibullovim te je stoga i odabran u tu svrhu. Eksperimentalni profil 1 opisan Weibullovim modelom pokazivao je nešto bolje statističke vrijednosti od onog opisanog Korsmejer-Peppasovim modelom. Budući da razlika nije bila prevelika, za opis je ipak odabran Korsmejer-Peppasov model kako bi se dva profila mogla jednostavnije uspoređivati, odnosno kako bi se mogle usporediti konstante brzina oslobađanja.

Slike 6 i 7 prikazuju usporedbu eksperimentalnih podataka i Korsmejer-Peppasovog kinetičkog modela. U tablici 5 dani su parametri Korsmejer-Peppasovog modela.



Slika 6. Usporedba eksperimentalnog profila oslobađanja celekoksiba i dobivenog Korsmejer-Peppasovim modelom u mediju 1



Slika 7. Usporedba eksperimentalnog profila oslobađanja celekoksiba i dobivenog Korsmeier-Peppasovim modelom u mediju 2

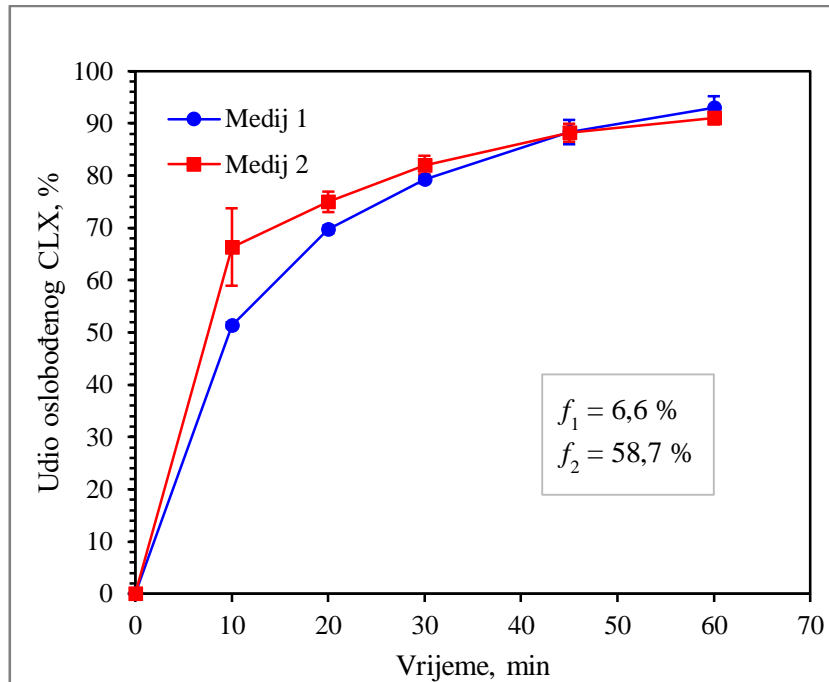
Tablica 5. Parametri Korsmeier-Peppasovog modela i vrijednosti R^2_{kor} .

| | k_{KP}, min^{-n} | n | R^2_{kor} |
|---------|---------------------------|-------|-------------|
| Medij 1 | 24,80 | 0,332 | 0,993 |
| Medij 2 | 51,03 | 0,138 | 0,992 |

EkspONENT oslobađanja, n , za oba je slučaja manji od 0,43 što znači da je dominantni mehanizam oslobađanja celekoksiba iz kapsula difuzija definirana Fickovim zakonima. Konstanta brzine oslobađanja (k_{KP}) veća je u mediju 2 što potvrđuje brže oslobađanje u početnom periodu. R^2_{kor} jedan je od statističkih parametara korištenih za procjenu primjenjivosti modela te, kao što se može vidjeti iz vrijednosti u tablici 5, ukazuje na vrlo dobro slaganje Korsmeier-Peppasovog modela s eksperimentalnim podacima.

Profile oslobađanja celekoksiba potrebno je usporediti ne bi li se u konačnici utvrdila međusobna zamjenjivost dviju *in vitro* metoda ispitivanja za potrebe farmaceutske industrije. Na slici 8 prikazana je usporedba profila u različitim medijima te vrijednosti faktora sličnosti i faktora razlike. Može se vidjeti kako je udio oslobođenog celekoksiba u mediju 2 do polovice ispitivanja veći od onog u mediju 1 (najviše u desetoj minuti, s razlikom od ~15 %). Nakon toga profili se gotovo izjednačuju. Iako se već vizualno može uočiti sličnost dvaju profila, potrebne su i konkretne vrijednosti koje će to potvrditi. U tu svrhu izračunati su faktor razlike (f_1) i faktor sličnosti (f_2). Faktori se računaju prema formulama (18) i (19). Profil dobiven u

mediju 1 postavljen je kao referentan, a onaj u mediju 2 kao testni. Ukoliko je vrijednost f_1 između 0 i 15 %, a f_2 između 50 i 100 % može se govoriti neznačajnoj razlici, odnosno zadovoljavajućoj sličnosti dvaju profila oslobađanja. Može se vidjeti da izračunate vrijednosti leže upravo unutar navedenog raspona te se stoga profili mogu smatrati sličnima, tj. metode ispitivanja ekvivalentnima.



Slika 8. Usporedba profila oslobađanja u mediju 1 i mediju 2 te faktor razlike (f_1) i faktor sličnosti (f_2)

Na kraju je provedena i statistička analiza varijance i T -test za svaku vremensku točku.

T -test je statistički test koji se koristi za uspoređivanje srednjih vrijednosti dviju grupa uzoraka. Procjenjuje se jesu li srednje vrijednosti dvaju setova podataka statistički značajno različite jedna od druge. Postoji nekoliko vrsta T -testova. Jedan od njih je nezavisni T -test koji se koristi za usporedbu aritmetičkih sredina dviju nepovezanih grupa uzoraka. Konkretna vrijednost može se izračunati iz formule:

$$t = \frac{\bar{x}_R - \bar{x}_T}{\sqrt{\frac{s^2}{n_R} + \frac{s^2}{n_T}}} \quad (20)$$

gdje je $\bar{x}_R - \bar{x}_T$ razlika između aritmetičke sredine referentnog i aritmetičke sredine testiranog uzorka, n broj mjerenja u uzorku, a s^2 procjena zajedničke varijance dvaju uzoraka:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^r (x_i - \bar{x}_R)^2 + \sum_{i=1}^t (x_i - \bar{x}_T)^2}{n_R + n_T - 2} \quad (21)$$

Uz određenu kritičnu T -vrijednost i poznavanje stupnja slobode, iz tablica se interpolacijom može odrediti p -vrijednost. P -vrijednost predstavlja mogućnost da je dobiveni rezultat, odnosno razlika između mjerenih varijabli posljedica slučajnosti. Izražava se kao razina statističke značajnosti i najčešće je dogovorno definirana na razini 0,05. Ukoliko je $p < 0,05$, vjerojatnost da je utvrđena razlika između mjerenih varijabli posljedica slučajnosti je manja od 5 %. U slučaju utvrđene statistički značajne razlike između mjerenih varijabli, nulta hipoteza se odbacuje i prihvaća se alternativna hipoteza.

U tablici 6 može se, uz srednje vrijednosti i standardne devijacije referentne (točke dobivene ispitivanjem u mediju 1) i testirane (točke dobivene ispitivanjem u mediju 2) grupe podataka, vidjeti i izračunata razlika između dviju navedenih srednjih vrijednosti. Može se uočiti da se vrijednost razlike točaka u desetoj minuti značajno razlikuje od ostalih. Iako je vrijednost u dvadesetoj minuti manja, također značajnije odstupa od ostalih. U tablici su ispisane i p -vrijednosti i vidljivo je da je jedino za spomenute vremenske točke p manji od dogovorene vrijednosti (0,05). To znači da je tada odstupanje među profilima značajno i ne može se zanemariti te u tim točkama ne vrijedi nulta hipoteza o sličnosti.

Postupak određivanja F -vrijednosti (formule 3, 4, 5) sastoji se od izračunavanja suma kvadrata (SS_{ukupno} , $SS_{između\ grupa}$, $SS_{unutar\ grupa}$), stupnjeva slobode (df) te srednje vrijednosti kvadrata (σ^2). Određena je vrijednost za svaku vremensku točku te se iz tablice može vidjeti da je varijabilnost između grupa (između točaka dva medija) veća od one unutar grupa (između tri točke jednog medija) što se moglo i očekivati. Ponovno se ističu vrijednosti dobivene u desetoj i dvadesetoj minuti.

Tablica 6. Rezultati statističke analize varijance (ANOVA); T -test za svaku vremensku točku

| Vrijeme (min) | Mean_R F(%) | SD_R | Mean_T F(%) | SD_T | Razlika T-R | F -vrijednost | p -vrijednost |
|---------------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-----------------|-----------------|
| 0 | 0,00 | 0,000 | 0,00 | 0,000 | 0,000 | 1,000 | 1,000 |
| 10 | 51,38 | 0,545 | 66,34 | 7,416 | -14,955 | 12,134 | 0,025 |
| 20 | 69,71 | 0,764 | 75,02 | 1,942 | -5,308 | 19,418 | 0,012 |
| 30 | 79,29 | 0,759 | 82,03 | 1,761 | -2,741 | 6,126 | 0,069 |
| 45 | 88,34 | 2,289 | 88,22 | 1,740 | 0,118 | 0,005 | 0,947 |
| 60 | 93,00 | 2,187 | 91,03 | 1,158 | 1,976 | 1,912 | 0,239 |

5. ZAKLJUČCI

Općenito, iz svih relevantnih izračunatih vrijednosti potvrđena je sličnost profila oslobađanja celekoksiba, a sukladno tomu i ekvivalentnost odnosno zamjenjivost dviju propisanih *in vitro* metoda ispitivanja. Oba profila mogu se zadovoljavajuće opisati Korsmeyer-Peppasovim modelom pa je time pojednostavljena usporedba dobivenih parametara. Faktor sličnosti i faktor razlike neosporno ukazuju na sličnost profila.

Međutim, važno je napomenuti da je pronađena i nezanemariva različitost profila u njihovom početnom dijelu. Razlog tomu je veće početno oslobađanje celekoksiba u mediju 2 negoli u mediju 1. Razlika koja se može zamijetiti već na grafičkom prikazu te iz vrijednosti konstanti brzina oslobađanja, potvrđena je i izračunatim *p*-vrijednostima dobivenima statističkom analizom varijance i *T*-testom koje ukazuju na neistinitost nulte hipoteze o sličnosti u dotičnim vremenskim točkama.

Također je potvrđena važnost provođenja više mjerenja kako bi se dobilo što više informacija o mogućim ishodima, te računanja i korištenja srednjih vrijednosti i standardnih devijacija koje govore o (ne)zanemarivosti varijacija među rezultatima.

6. LITERATURA

- [1] Y. Qiu, Y. Chen, G. G. Z. Zhang, L. Yu, R. V. Mantri, *Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory & Practice*, Elsevier, 2017
- [2] J. Dressman, J. Krämer, *Pharmaceutical Dissolution Testing*, Taylor & Francis Group, 2005
- [3] <https://pacificbiolabs.com/stages-of-drug-development> (3.8.2019.)
- [4] <https://www.eurofins.com/biopharma-services/cdmo/services/biologics-dsdp-development-manufacturing/pre-formulation-formulation-screening/> (5.8.2019.)
- [5] G. O. Elhassa, K. O. Alfarouk, *Drug Development: Stages of Drug Development*, J. Pharmacovigilance 3 (3) (2015)
- [6] *European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 8th Edition*
- [7] J. Emami, *In vitro - In vivo Correlation: From Theory to Applications*, J. Pharm. Pharmaceut. Sci. 9 (2) (2006) 169-189.
- [8] J-M. Cardot, E. Beyssac, M. Alric, *In Vitro-In Vivo Correlation: Importance of Dissolution in IVIVC*, *Dissolution Technologies* 14 (2007) 15-19.
- [9] <https://www.fda.gov/media/70939/download> (9.8.2019.)
- [10] P. Costa, J. M. Sousa Lobo, *Modeling and comparison of dissolution profiles*, *Eur. J. Pharm. Sci.* **13** (2001) 123–133.
- [11] S. Dash, P. N. Murthy, L. Nath, P. Chowdhury, *Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems*, *Acta poloniae pharmaceutica* 67 (3) (2010) 217-223.
- [12] <http://km.com.hr/wp-content/uploads/2018/04/14.-Analiza-varijance-Diskriminacijska-analiza.pdf> (1.9.2019.)
- [13] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Celecoxib> (6.9.2019.)
- [14] <http://www.plivamed.net/aktualno/clanak/9666/Celekoksib-nesteroidni-antireumatik-selektivni-COX-2-inhibitor.html> (6.9.2019.)