

Korelacije in vitro-in vivo za farmaceutske alternative dronedaron-hidroklorida

Vučetić, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:716223>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-26**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Matea Vučetić

**KORELACIJE *IN VITRO*–*IN VIVO* ZA FARMACEUTSKE
ALTERNATIVE DRONEDARON-HIDROKLORIDA**

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Gordana Matijašić

Članovi ispitnog povjerenstva:
prof. dr. sc. Gordana Matijašić
izv. prof. dr. sc. Krunoslav Žižek
izv. prof. dr. sc. Igor Dejanović

Zagreb, rujan 2020.

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

SAŽETAK

Glavni cilj tijekom razvoja dozirnih oblika u farmaceutskoj industriji je dobro razumijevanje *in vitro* i *in vivo* ponašanja dozirnih oblika. Jedan od izazova tijekom istraživanja je i koreliranje *in vitro* ponašanja lijeka različitih formulacija s *in vivo* profilom – izrada *in vitro*–*in vivo* korelacija (IVIVK). Razvoj takvog alata smanjuje vrijeme razvoja lijeka, ekonomizira resurse i omogućava bolju kvalitetu proizvoda. Sve veća upotreba IVIVK govori o njihovom velikom značaju za farmaceutsku industriju.

Dronedaron-hidroklorid (DNR) kao djelatna tvar korišten je za izradu farmaceutskih alternativa oralnih dozirnih oblika; peleta, 3D tiskanih tableta i kapsula te mikrokapsula oblaganih različitim polimerima. Ispitano je *in vitro* oslobađanje djelatne tvari, a softverom *GastroPlus*TM izrađene simulacije *in vivo* ponašanja i pripadne farmakokinetike. Na temelju dobivenih podataka izrađene su korelacije koje opisuju ponašanje pojedinog dozirnog oblika.

Rezultati ispitivanja pokazali su izvrsno slaganje za impregnirane i obložene pelete manjeg sadržaja DNR, 3D tiskane kapsule s debljinom stijenke od 0,50 mm te mikrokapsule oblagane metakrilatnim kopolimerom. Za daljnja istraživanja pogodne su i 3D tablete s najmanjom gustoćom ispune (25 %) te 3D tiskane kapsule većih debljina stijenke (0,75 i 1 mm).

Ključne riječi:

farmaceutske alternative, dronedaron-hidroklorid, simulacije, *GastroPlus*TM, IVIVK

ABSTRACT

***In vitro–in vivo* correlations for pharmaceutical alternatives of dronedarone hydrochloride**

A key goal in pharmaceutical development of dosage forms is a good understanding of the *in vitro* and *in vivo* performance of dosage forms. One of the challenges in their research is correlating *in vitro* drug release information with the *in vivo* drug profiles – establish of *in vitro–in vivo* correlations (IVIVC). Such a tool shortens the drug development period, economizes the resources and leads to improved product quality. Increased activity in developing IVIVCs indicates their value to the pharmaceutical industry.

Dronedarone hydrochloride was used as active pharmaceutical ingredient for making pharmaceutical alternatives of oral dosage forms; pellets, 3D printed tablets and capsules and microcapsules coated with polymers. *In vitro* release profiles were obtained and software *GastroPlus*TM was used to create simulations of *in vivo* behaviour and pharmacokinetics. Based on the data obtained, correlations that describe behavior of dosage forms were established.

The research results showed good agreement for impregnated and coated pellets with lower dose of DNR, 3D printed capsules with 0.50 mm wall thickness and microcapsules coated with methacrylate copolymer. 3D printed tablets with 25 % of tablet infill and 3D printed capsules with thicker walls (0.75 and 1 mm) are suitable for further research.

Key words:

pharmaceutical alternatives, dronedarone hydrochloride, simulations, *GastroPlus*TM, IVIVC

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Dozirni oblici	2
2.1.1. Vrste dozirnih oblika	2
2.1.2. Farmaceutске alternative	4
2.2. Faze razvoja lijeka	5
2.2.1. Otkrivanje	5
2.2.2. Razvoj i preklinička ispitivanja	6
2.2.3. Klinička ispitivanja	7
2.2.4. Budućnost i izazovi	9
2.3. <i>In vitro</i> ispitivanje oslobađanja	10
2.3.1. Mehanizam oslobađanja tvari	10
2.3.2. Razvoj i vrijednost testa oslobađanja	14
2.3.3. Ispitivanje oslobađanja iz čvrstih oralnih dozirnih oblika	15
2.4. <i>In vitro-in vivo</i> korelacije (IVIVK)	16
2.4.1. Povijesni razvoj IVIVK	16
2.4.2. Definicija IVIVK	17
2.4.3. Matematički i računalni alati za razvoj korelacija	17
2.4.4. Razine korelacija	20
2.4.5. Važnost IVIVK	22
3. EKSPERIMENTALNI DIO	25
3.1. Dronedaron-hidroklorid	25
3.2. Farmaceutске alternative dronedaron-hidroklorida	25
3.2.1. Pelete	25
3.2.2. 3D tiskane tablete	30
3.2.3. 3D tiskane kapsule	33
3.2.4. Mikrokapsule	34
3.3. Ispitivanje oslobađanja metodama <i>in vitro</i>	38
3.3.1. Ispitivanje oslobađanja prema FDA metodi	38
3.3.2. UV/Vis spektrofotometrija	39
3.4. Obrada podataka	40
3.4.1. GastroPlus™	40
3.4.2. Simulacije	41
3.4.3. Korelacije i konvolucija	43
4. REZULTATI	45
4.1. Komercijalna tableta	45

4.2. Pelete	47
4.3. 3D tiskane tablete	50
4.4. 3D tiskane kapsule.....	54
4.5. Mikrokapsule	57
5. RASPRAVA.....	64
5.1. Komercijalna tableta.....	64
5.2. Pelete	64
5.3. 3D tiskane tablete	65
5.4. 3D tiskane kapsule.....	67
5.5. Mikrokapsule	67
6. ZAKLJUČAK	70
7. LITERATURA.....	71

1. UVOD

Posljednjih godina koncept i primjena *in vitro-in vivo* korelacija (IVIVK) dozirnih oblika postaje bitan fokus farmaceutske industrije, ali i obrazovnih i regulatornih sektora. Razvoj i optimizacija određene formulacije integrirani je dio procesa proizvodnje i marketinga svakog lijeka, što je financijski i vremenski iscrpljujuće. Kako bi se tome doskočilo, poželjno je razviti *in vitro* testove koji ukazuju na *in vivo* ponašanje i biodostupnost određenog dozirnog oblika te razviti korelacije koje ih opisuju.

Za razvoj *in vitro-in vivo* korelacija potrebna su dva seta podataka. Prvi set podataka dobiva se *in vitro* ispitivanjem oslobađanja, najčešće u obliku postotka oslobođenog u ovisnosti o vremenu. Drugi set podataka je *in vivo*, najčešće u obliku ovisnosti koncentracije djelatne tvari u plazmi o vremenu s definiranim farmakokinetičkim parametrima. Potom se setovi podataka opisuju jednadžbama i razvijaju korelacije – prediktivni matematički modeli koji stvaraju vezu između *in vitro* oslobađanja i *in vivo* odgovora.

In vitro ispitivanje oslobađanja uveliko se koristi za svrhu kontrole kvalitete, ispitivanje stabilnosti formulacije i proizvoda itd. Kao takvi mogu, ali i ne moraju biti sukladni s *in vivo* ponašanjem dozirnog oblika. Razvoj i evaluacija IVIVK pomaže uspostavljanju testa oslobađanja kao surogata za ispitivanje bioekvivalencije na ljudima, što smanjuje broj potrebnih ispitivanja ukoliko dođe do promjene u formulaciji, procesu proizvodnje ili opremi. Također, može se koristiti i kao podrška i/ili validacija testa oslobađanja i njegovih specifikacija.

Cilj ovog rada je izraditi korelacije za farmaceutske alternative; pelete, 3D tiskane tablete i kapsule te mikrokapsule koje sadrže dronedaron-hidroklorid kao djelatnu tvar. Nakon ispitivanja *in vitro* oslobađanja djelatne tvari, pomoću naprednih softverskih alata je simulirano *in vivo* ponašanje i izrađene su korelacije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Dozirni oblici

Lijek je učinkovit ukoliko se u tijelu oslobađa u pogodnim uvjetima i ciljanom vremenu. Sama *djelatna farmaceutska tvar* (eng. *active pharmaceutical ingredient* – API) definira se kao kemijski spoj ili kombinacija spojeva koja se koristi u farmaceutskom proizvodu, namijenjena za dijagnozu, liječenje ili prevenciju bolesti, a može imati i direktan utjecaj na obnavljanje, ispravljanje ili mijenjanje fizioloških funkcija u tijelu.¹ Međutim, direktna klinička upotreba djelatnih farmaceutskih tvari je rijetka, budući da rukovanje i pravilno doziranje može biti komplicirano, čak i nemoguće pri vrlo niskim dozama. Neki od njih su osjetljivi na svjetlost, vlagu ili nestabilni u prisustvu kisika, mogu degradirati na mjestu otpuštanja, a u većim koncentracijama mogu uzrokovati lokalne iritacije ili ozljede. Također, njihovo samostalno korištenje značilo bi nemogućnost modificiranja i poboljšanja farmakokinetičkog profila samog lijeka. Stoga se, kako bi se prevladale poteškoće sigurne i učinkovite dostave lijeka, razvijaju različiti dozirni oblici.

Dozirni oblici su sredstva pomoću kojih se molekule lijeka tj. djelatne tvari dostavljaju do željenog mjesta oslobađanja u tijelu kako bi se ostvario optimalan željeni učinak te minimalne neželjene nuspojave.¹ Potreba za razvojem dozirnih oblika može se promatrati sa strane sigurnosti i dobrobiti lijeka kao zaštita lijeka od moguće nepovoljne okoline (svjetlost, vlaga, kisik) ili zaštita od nepovoljnih uvjeta u organizmu (želučana kiselina). Ako tu potrebu promatramo sa strane sigurnosti i korisnosti za pacijenta, sagledavamo pogodne doze za djecu ili starije pacijente, prevenciju iritacija i modificiranje farmakokinetike lijeka za optimalno iskorištenje i minimiziranje nuspojava. Također, razvojem različitih dozirnih oblika ublažavamo okus i miris same djelatne tvari i prilagođavamo njegov oblik kako bi se otopio na željeni način te raspodijelio u tjelesnom tkivu.²

2.1.1. Vrste dozirnih oblika

Dozirni oblici mogu se klasificirati prema načinu uzimanja i prema svom fizičkom obliku, kako je поближе prikazano Tablicom 1.

Tablica 1. Vrste dozirnih oblika uz načine uzimanja i mjesta otpuštanja²

Oralni	Probavni trakt	Čvrsti	Pilula ▪ Tableta ▪ Kapsula
		Tekući	Otopina ▪ Suspenzija ▪ Emulzija ▪ Sirup ▪ Elikzir ▪ Tinktura ▪ Hidrogel
	Sublingvalni	Čvrsti	Raspadljive tablete za usta ▪ Pastile ▪ Tablete za žvakanje
		Tekući	Tekućina za ispiranje usta ▪ Pasta za zube ▪ Mast ▪ Oralni sprej
	Dišni put	Čvrsti	Inhalator praška ▪ Uređaj za pušenje
		Tekući	Tlačni dozator inhalatora s tekućinom ▪ Raspršivač
		Plinoviti	Maska za kisik ▪ Koncentrator kisika ▪ Anesteziološki aparat ▪ Uređaj za analgeziju
	Očni / Otološki / Nazalni	Sprej za nos ▪ Kapi za uši ▪ Kapi za oči ▪ Mast ▪ Hidrogel ▪ Nanočestična suspenzija ▪ Adhezivi za sluznicu	
	Urogenitalni	Mast ▪ Pesar ▪ Vaginalni prsten ▪ Vaginalni tuš ▪ Intrauterinalni uložak	
Enteralni	Mast ▪ Čepić ▪ Klistir (otopina, hidrogel) ▪ Hranjivi klistir		
Dermalni	Mast ▪ Liniment ▪ Pasta ▪ Film ▪ Hidrogel ▪ Liposomi ▪ Tretman za vezikule ▪ Krema ▪ Losion ▪ Balzam za usne ▪ Šampon ▪ Kožni flaster ▪ Transdermalni flaster ▪ Transdermalni sprej ▪ Mlazni injektor		
Injekcijski / Infuzijski	Koža	Intradermalni ▪ Potkožni ▪ Transdermalni implantat	
	Organi	Intrakavernozi ▪ Intravitrealni ▪ Transkleralni	
	Centralni živčani sustav	Intracerebralni ▪ Intratekalni ▪ Epiduralni	
	Cirkulatorni / Mišićno-koštani sustav	Intravenski ▪ Intrakardijalni ▪ Intramuskularni ▪ Intraoskozni ▪ Intraperitonealni	

Kombiniranjem lijekova i različitih pomoćnih tvari ili punila dobivaju se i različiti dozirni oblici. Pomoćne tvari služe kako bi rastvorile, suspendirale, obložile, razrijedile, stabilizirale ili tek obojale i dale miris ili oblik djelatnoj tvari te stvorile siguran, stabilan i djelotvoran farmaceutski pripravak.

2.1.2. Farmaceutske alternative

Prema Pravilniku o ispitivanju bioraspoloživosti i bioekvivalenciji lijekova Republike Hrvatske (Pravilnik), *farmaceutske alternative* jesu gotovi lijekovi koji sadržavaju istu ljekovitu tvar, ali u različitom kemijskom obliku (npr. soli, ester itd.) ili su (iste ljekovite tvari) u različitim oblicima ili dozama. Terapijski su ekvivalentne drugom lijeku kad imaju istu djelotvornost i neškodljivost kao drugi lijek kojem je djelotvornost i neškodljivost utvrđena.³

Pravilnikom su definirani i pokusi utvrđivanja biološke raspoloživosti odnosno provjere biološke ekvivalencije u odnosu na referentni pripravak, koji se mogu obavljati na različite načine:

1. Praćenjem koncentracija djelatne tvari u krvi, krvnim tekućinama ili u mokraći na skupini zdravih dobrovoljaca ili bolesnika.
2. Praćenjem koncentracija djelatne tvari u krvi, krvnim tekućinama ili u mokraći na skupini pokusnih životinja.
3. Praćenjem farmakodinamskog djelovanja lijeka u skupini zdravih dobrovoljaca odnosno bolesnika.
4. U kliničkom pokusu na skupini bolesnika.
5. Pokusom brzine oslobađanja djelatne tvari iz pripravka u *in vitro* uvjetima.³

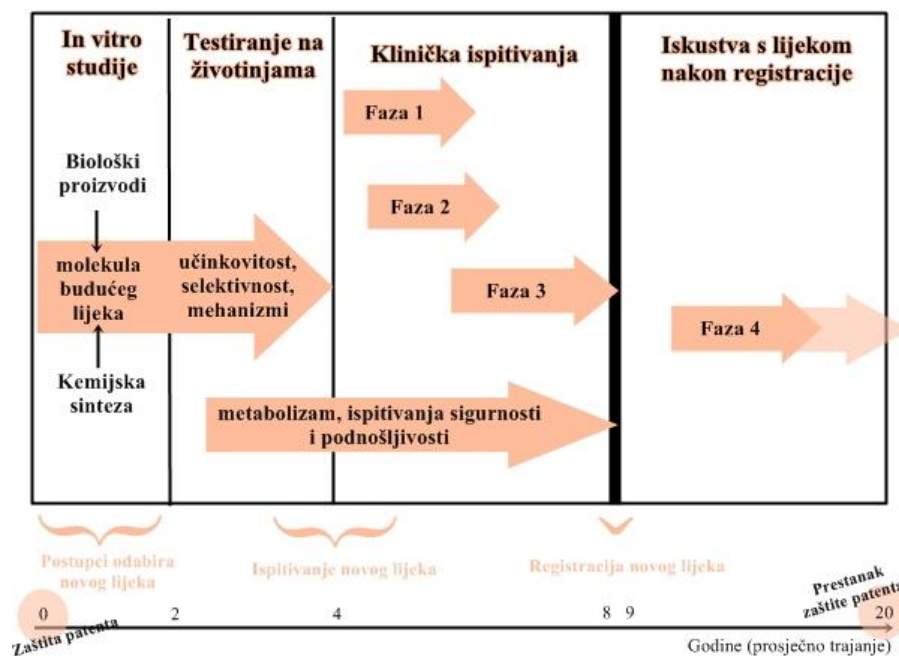
Tijekom razvoja farmaceutskih alternativa pozornost se daje *bioraspoloživosti*, odnosno brzini i stupnju apsorpcije ljekovite tvari iz farmaceutskog oblika koja se definira krivuljom odnosa koncentracije i vremena u sistemskoj cirkulaciji ili izlučivanjem u urin, te *bioekvivalenciji*. Bioekvivalencija lijekova postoji u slučajevima kada su dva lijeka farmaceutski ekvivalentni i njihova bioraspoloživost (stupanj i širina apsorpcije) nakon primjene u istom molarnom iznosu je slična do tog stupnja da je njihov učinak, uzimajući u obzir djelotvornost i neškodljivost, isti.³

Uvriježeno je razmišljanje kako je za inovaciju ili promjenu na lijeku potreban patent, no suvremena istraživanja pokreću pitanja o učinkovitosti patenata u poticanju inovativnih aktivnosti općenito.⁴ Trenutačni sustav patentiranja lijekova ima svoje nedostatke poput povećanja troškova otkrivanja novih terapija te samim time smanjenje financijskih poticaja za inovacije. Vrijeme između otkrića i odobrenja lijeka je dugo, a tvrtke koje se bave inovacijama sudjeluju u skupim borbama s rivalskim firmama i generičkim proizvođačima lijekova. Raspravlja se o alternativama poput javnih subvencija za osnovna istraživanja i

nagrada za nove lijekove.⁵ Takve rasprave potiču inovativnost i zainteresiranost znanosti u vidu doprinosa razvoju farmaceutskih alternativa.

2.2. Faze razvoja lijeka

Razvijanje novih lijekova je dugotrajan proces (Slika 1). U prosjeku od otkrića novog lijeka pa do njegovog puštanja na tržište može proći 8 do 12 godina. Također, zahtijeva i velike novčane izdatke, a tek 20 % novih lijekova vrati uložena sredstva. Farmaceutske tvrtke pronalaze načine da udovolje rastućim potrebama zdravstvenog sustava i vrate sredstva uložena u istraživanje i razvoj.⁶



Slika 1. Vremenski prikaz faza razvoja lijeka⁸

2.2.1. Otkrivanje

Otkriće lijeka u prvom redu obuhvaća identifikaciju i definiranje ciljne molekule za lijek te potragu za potencijalnim kandidatima za lijekove. Za farmaceutski razvoj lijeka potrebno je analizirati od 5 000 – 10 000 kemijskih spojeva koji podliježu laboratorijskim testiranjima. Od toga ih oko 250 ulazi u pretklinička ispitivanja, a 5 u klinička.⁶ Otkrivanje može ići u smjeru kemijskog modificiranja već poznate molekule lijeka i probiranja unutar velikog broja biološki aktivnih prirodnih produkata, peptida, nukleinskih kiselina ili drugih organskih molekula.⁷

Za samo otkrivanje lijeka potrebna su istraživanja iz različitih područja: kemije, biokemije, fiziologije, mikrobiologije i farmakologije. Prve korake u procesu rade znanstvenici i liječnici u raznim istraživačkim institucijama ili sveučilištima, a rezultati njihovih istraživanja se objavljuju u znanstvenim i medicinskim časopisima. Ti rezultati olakšavaju prepoznavanje potencijalnih novih ciljeva otkrivanja lijekova. Cilj otkrivanja može biti receptor za lijek, enzim, proces biološkog transporta ili bilo koji drugi proces uključen u metabolizam. Kada se definira cilj, glavnina daljnjeg rada, istraživanja i razvoja je na farmaceutskim kompanijama.⁶

2.2.2. Razvoj i pretklinička ispitivanja

Pretklinička toksikološka i farmakološka ispitivanja najbolje su regulirani i pažljivo praćeni programi razvoja novog lijeka. Obavezno prethode kliničkim istraživanjima i ne slijede nužno jedan za drugim, već se međusobno preklapaju.

Kandidati za potencijalne lijekove ulaze u niz pokusa poznatih pod nazivom *probiranje svojstava lijeka* (eng. *drug screening*). Cilj je različitim biološkim metodama na molekularnom i staničnom nivou, kao i na nivou organa i cijelog organizma životinja, definirati aktivnost i selektivnost potencijalnog lijeka.⁷ Tako se, provođenjem mjerenja prikazanih Tablicom 2, definira *farmakološki profil* kandidata.

Tablica 2. Neki od testova koji se provode za određivanje farmakološkog profila potencijalnog blokatora α -receptora⁸

Ciljna mjesta ispitivanja	Vrste tkiva ili životinje	Način primjene	Mjerenja
Molekularna razina			
vezanje za receptore	stanične membrane iz tkiva; stanične kulture; klonirani receptori	<i>in vitro</i>	afinitet i selektivnost za receptore
aktivnost enzima	simpatički živci nadbubrežne žlijezde, pročišćeni enzim	<i>in vitro</i>	inhibicija enzima i selektivnost
citokrom P-450	jetra	<i>in vitro</i>	inhibicija enzima; učinci na metabolizam lijeka
Stanična razina			
funkcija stanice	stanične kulture	<i>in vitro</i>	dokazi za aktivnost receptora
izolirano tkivo	krvne žile srca, pluća, ileuma (štakor ili zamorac)	<i>in vitro</i>	učinci na kontrakciju i relaksaciju krvnih žila: selektivnost za vaskularne

			receptore
sistemni učinci / modeli bolesti	pas, mačka (anestezija)	parenteralna	promjene sistoličkog i dijastoličkog tlaka
krvni tlak	hipetenzivni štakor (budnost)	oralna	antihipertenzivni učinci
učinci na srce	pas (budnost) pas (anestezija)	oralna parenteralna	elektrokardiogram inotropni, kronotropni učinci, minutni volumen, ukupni periferni otpor
periferni autonomni živčani sustav	pas (anestezija)	parenteralna	učinci na odgovor poznatih lijekova, električka simulacija središnjeg i perifernog živčanog sustava
učinci na respiratorni sustav	pas, zamorac	parenteralna	učinci na frekvenciju disanja, tonus dišnih putova
diuretička aktivnost	pas	oralna, parenteralna	natriureza, kaliureza, diureza, protok krvi kroz bubreg, veličina glomerularne filtracije
učinci na probavni sustav	štakor	oralna	tonus probavnog sustava, sekrecija
učinci na cirkulirajuće hormone, kolesterol, glukoze u krvi	štakor, pas	parenteralna, oralna	koncentracije u serumu
koagulacija krvi	kunić	oralna	vrijeme zgrušavanja krvi, retrakcija ugruška, protrombinsko vrijeme
središnji živčani sustav	miš, štakor	parenteralna, oralna	stupanj sedacije, mišićna relaksacija, lokomotorna aktivnost, stimulacija

Kandidat za lijek koji je zadovoljio kriterije početnog odabira i kojemu je definiran farmakološki profil ulazi u detaljni pretklinički razvoj koji obuhvaća ispitivanja sigurnosti i podnošljivosti. Provode se pokusi akutne, višekratne, kronične toksičnosti kao i genotoksičnosti, a potom i pokusi kancerogenosti, reproduktivne toksičnosti te testovi iritacije i lokalne osjetljivosti.¹⁰

2.2.3. Klinička ispitivanja

Klinička ispitivanja su znanstveno-medicinska ispitivanja koja se provode na zdravim ili bolesnim ispitanicima koji su dobrovoljno dali pristanak za sudjelovanje. Osnovni razlog za provođenje kliničkih ispitivanja lijekova je značajna razlika u djelovanju lijekova na životinje

i pojedine životinjske vrste i djelovanja na čovjeka. Pritom dolazi do različite apsorpcije, distribucije, metabolizma i izlučivanja lijeka. Također, niz bolesti se ne pojavljuje u životinja te se učinak lijekova namijenjenih tim bolestima mora i može ispitati tek na čovjeku.

Mogu se podijeliti na različite vrste:¹⁰

- prospektivna i retrospektivna,
- ispitivanje koje se provodi na jednoj grupi bolesnika,
- ispitivanja u kojima se uspoređuju dvije grupe bolesnika,
- longitudinalno ispitivanje,
- paralelno ispitivanje,
- križani (unaksni) tip ispitivanja i
- randomizacija.

Klinička ispitivanja provode se prema unaprijed određenom planu ispitivanja i u skladu s nizom međunarodnih propisa, konvencija i smjernica te propisa zemlje u kojima se provode. Velik broj osoba, državna i druga tijela redovito kontroliraju i nadgledaju cjelokupni postupak provođenja kliničkog ispitivanja i tako osiguravaju da se svi koji sudjeluju u provođenju ispitivanja pridržavaju potrebnih propisa i postupaka.⁸ Njihovo provođenje podijeljeno je u četiri faze.

Faza 1 ispitivanja započinje prvom primjenom lijeka u ljudi. Provodi se na malom broju ispitanika (20 – 100) koji su najčešće zdravi dobrovoljci. U ovoj se fazi ispituje ponašanje lijeka u organizmu, njegova raspoloživost te mogući neželjeni događaji primjene lijeka. Budući da je najčešće riječ o zdravim ispitanicima, cilj nije liječenje bolesti, već utvrditi raspon doze koju je potrebno primijeniti da bi lijek u djelotvornoj dozi stigao do ciljnog mjesta u organizmu. Važni su i podaci o podnošljivosti lijeka, odnosno prirodni štetnih događaja i nuspojava, a provodi se u specijaliziranim kliničko-farmakološkim odjelima s ispitivačima kliničkim farmakolozima.⁷ To je jedina faza kliničkog ispitivanja u kojoj se ispitanicima daje novčana naknada za sudjelovanje u ispitivanju. Nakon što se ispitivanjima prve faze utvrdi dinamika lijeka u organizmu i razumna sigurnost primjene lijeka, kreće se s ispitivanjima druge faze.⁹

U drugoj fazi započinje se ispitivati djelotvornost lijeka kod većeg broja ispitanika (obično do nekoliko stotina) koji boluju od određene bolesti. Poblježe se određuju optimalne djelotvorne doze lijeka i prikupljaju važni podaci o sigurnosti primjene lijeka i načinu ponašanja lijeka u tijelu ljudi koji boluju od neke bolesti, što se može razlikovati u odnosu na zdrave osobe. Cilj

ove faze ispitivanja je utvrditi ima li lijek željeni terapijski učinak uz prihvatljive štetne događaje.⁹

Nakon što se u drugoj fazi pokaže jednakost ili prednost liječenja ispitivanim lijekom u odnosu na postojeće standardno liječenje, provodi se faza 3. Ta faza služi za potvrdu dobivenih podataka i obično uključuje veći broj ispitanika u brojnim centrima i zemljama širom svijeta. Lijek se obično primjenjuje u duljem razdoblju kod bolesnika koji imaju razvijen različit stupanj težine bolesti, u kombinaciji s drugim lijekovima itd. Nakon dovršetka ispitivanja, obrade i analize podataka te objave rezultata ispitivanja, za lijekove za koje se utvrdilo da su djelotvorni i pritom prihvatljiva sigurnosnog profila, podaci se u obliku registracijskih dosjea predaju na pregled regulatornim tijelima različitih zemalja. U slučaju povoljne ocjene, dobiva se odobrenje za stavljanje lijeka u promet (registracija lijeka) te lijek postaje dostupan za liječenje bolesnika širom svijeta.⁹

Klinička ispitivanja određenog lijeka ne završavaju registracijom lijeka. Posljednja, četvrta faza ispitivanja provodi se na većem broju ljudi nakon što je lijek odobren za primjenu i služi prikupljanju što detaljnijih podataka o sigurnosti primjene lijeka, osobito nuspojava koje se javljaju u rijetkim slučajevima. Ta vrsta ispitivanja često se zove i *postmarketinško ispitivanje* ili *ispitivanje promatranjem*.⁹ Na taj način može se utvrditi interakcija novog lijeka s hranom i lijekovima koji su u prethodnim fazama strogo kontrolirani.⁷

2.2.4. Budućnost i izazovi

U novije vrijeme zbog smanjenog broja otkrića novih molekula i velikog ekonomskog pritiska potrebno je uočiti nove izazove farmaceutskog istraživanja i razvoja te implementirati nove strategije i razviti nove pristupe ili sisteme prema otkrićima.¹⁰

Na Slici 2 prikazani su mogući scenariji i novi pristupi budućem razvoju lijekova, a temelje se na povezivanju i suradnji akademske zajednice i farmaceutskih tvrtki, pri čemu je naglasak na harmonizaciji ciljeva i pristupa, izgradnji univerzalnog informacijskog sustava za praćenje noviteta te edukaciji svih sudionika procesa.



Slika 2. Potencijalni scenariji farmaceutskog razvoja¹⁰

2.3. *In vitro* ispitivanje oslobađanja

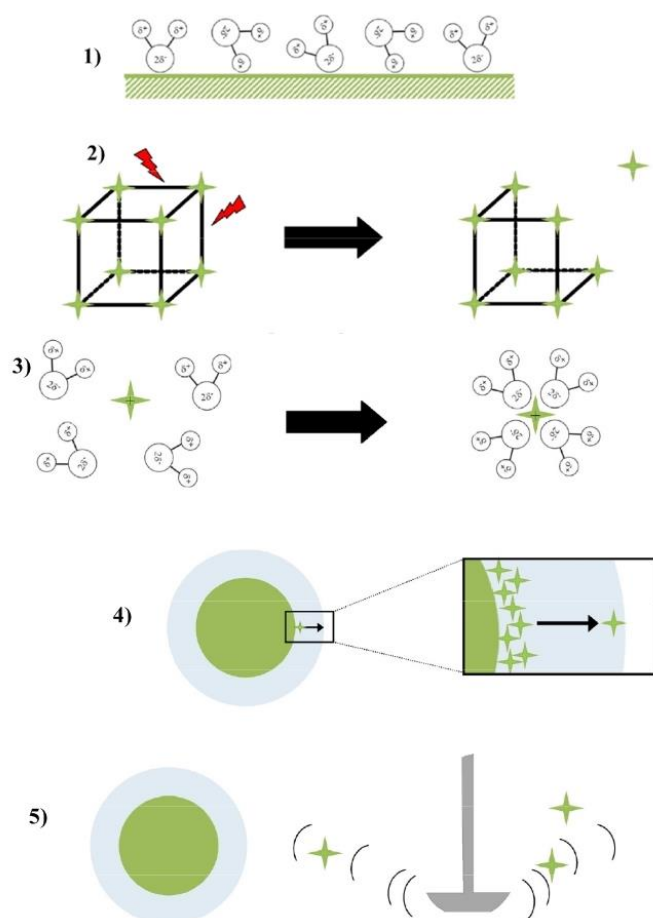
Oslobađanje djelatne tvari iz dozirnog oblika je proces u kojem djelatna tvar napušta dozirni oblik, otapa se te postaje dostupna za apsorpciju i farmakološki učinak.¹¹ Posljednjih godina oslobađanje lijeka iz čvrstih farmaceutskih dozirnih oblika je predmet intenzivnih i profitabilnih znanstvenih dostignuća, kako tijekom razvoja formulacije tako i za potrebe kontrole kvalitete. Kada god se proizvede ili razvije čvrsti dozirni oblik potrebno je osigurati oslobađanje lijeka na odgovarajući način, stoga se farmaceutska industrija i nadležna tijela usmjeravaju prema studijama za oslobađanje lijekova.¹²

2.3.1. Mehanizam oslobađanja tvari

Otapanje lijeka preduvjet je za njegov učinkovit transport kroz tijelo, te za njegovu bioraspoloživost i terapijski učinak. Lijek se otapa u kontaktu s tjelesnim tekućinama te prolazi razne barijere u organizmu kako bi stigao do ciljanog odredišta.¹¹ Ukoliko se čvrsta čestica lijeka otapa u vodenom mediju, tada nestaje granica dviju faza te nastaje homogena

faza, odnosno vodena otopina lijeka. Taj proces može se podijeliti u pet glavnih koraka¹³ (Slika 3):

1. Močenje površine čestice lijeka vodom.
2. Pucanje veza čvrstog stanja u čestici lijeka (npr. privlačne elektrostatske sile u kristalu koji se sastoji od kationa i aniona).
3. Pojedinačne molekule/ioni/atomi lijeka bivaju okruženi slojem molekula vode, dolazi do solvatacije.
4. Pojedinačne molekule/ioni/atomi lijeka difundiraju s površine čestice lijeka kroz površinski stacionirani sloj medija do mase miješanog medija. Tanki površinski stacionarni sloj medija postoji čak i pri snažnom miješanju medija (zbog adhezivnih sila), a njegova debljina ovisi o stupnju miješanja.
5. Konvektivni prijenos tvari (molekula/ion/atoma lijeka) kroz tekućinu, uzrokovan miješanjem tekućine.



Slika 3. Shematski prikaz pet glavnih koraka procesa otapanja čvrste čestice lijeka u vodenom mediju¹³

Pojmovi *otapanje lijeka* (eng. *drug dissolution*) i *oslobađanje lijeka* (eng. *drug release*) nisu nužno sinonimi. Otapanje lijeka obuhvaća pet prethodno opisanih koraka, dok je oslobađanje lijeka znatno kompleksniji pojam, koji ujedno uključuje i otapanje lijeka. Oslobađanje lijeka sastoji se od niza procesa koje je moguće opisati mehanističkim modelima koji se temelje na stvarnim fenomenima kao što su difuzija, otapanje, bubrenje, taloženje i razgradnja. Ukoliko je jedan od koraka puno sporiji od ostalih, brzi se procesi mogu zanemariti kod kvantifikacije konačne brzine oslobađanja, pa je matematički model ograničen samo na najsporiji korak u nizu i smanjuje se kompleksnost matematičkih jednažbi za opis procesa.¹¹

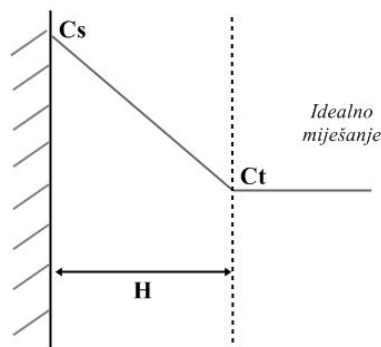
Prema Higuchiju¹⁴ („otac“ matematičkog modeliranja oslobađanja lijeka) postoje tri modela koji samostalno ili u kombinaciji mogu opisati mehanizme oslobađanja lijeka:

- Model difuzijskog sloja

Ovaj model pretpostavlja da sloj kapljevine (debljine H) uz površinu krutine stagnira kada kapljevina iz spremnika miješanjem prelazi preko površine određenom brzinom. Pretpostavlja se da reakcija na granici faza čvrsto-kapljevito trenutačno stvara zasićenu otopinu krutine (koncentracije c_s) u statičnom sloju kapljevine (Slika 4). Brzina otapanja je u cijelosti upravljana difuzijom krutine iz statičnog sloja u masu kapljevine, u skladu s prvim Fickovim zakonom:

$$J = -D_f \frac{dc}{dx} \quad (1)$$

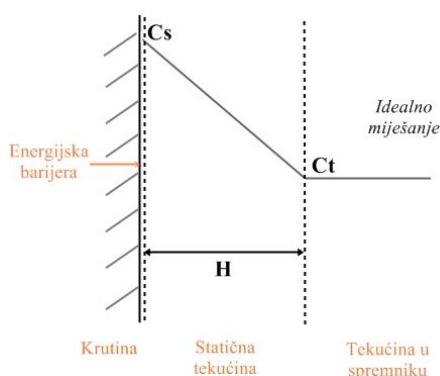
gdje je J količina tvari koja prolazi okomito kroz jedinicu površine po vremenu (fluks), D_f koeficijent difuzije, a dc/dx koncentracijski gradijent. Nakon vremena t , koncentracija između granice statičnog sloja i mase kapljevine u spremniku se izjednačava i postaje c_t , odnosno koncentracijski gradijent nestaje, pod pretpostavkom da je miješanje idealno. Teorija predviđa da je brzina otapanja jednolika ukoliko je koncentracijski gradijent konstantan.¹⁵



Slika 4. Shematski prikaz modela difuzijskog sloja

- Model međufazne barijere

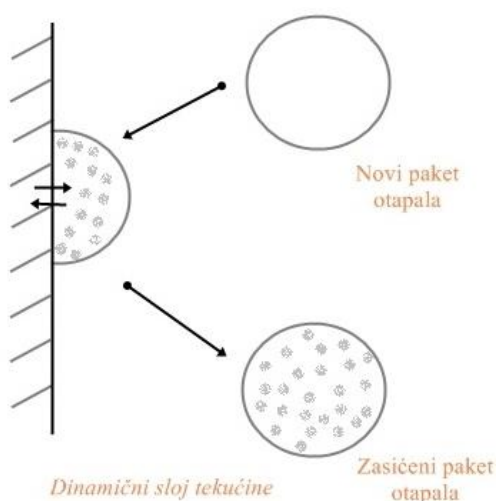
U modelu međufazne barijere pretpostavlja se da reakcija na granici faza čvrsto-kapljevito nije trenutačna zbog visoke energije aktivacije barijere koja se mora aktivirati prije nego se krutina otopi. Nakon dostizanja energije aktivacije mehanizam otapanja jednak je kao u modelu difuzijskog sloja, a koncentracija na granici statičnog sloja kapljevine postaje jednaka koncentraciji c_t nakon vremena t (Slika 5). Brzina difuzije u statičnom sloju je relativno brza u usporedbi s dostizanjem energijske barijere koja postaje ograničenje procesa oslobađanja.¹⁵



Slika 5. Shematski prikaz modela međufazne barijere

- Danckwertov model

Danckwertov model pretpostavlja da makroskopski „paketi“ otapala dolaze do granice faza čvrsto-kapljevito vrtložnom difuzijom slučajnim rasporedom. Na granici faza, ti „paketi“ mogu apsorbirati otoplenu tvar, odnosno lijek, i potom se zamijeniti novim „paketom“ otapala (Slika 6). Taj postupak obnove površine povezan je s brzinom prijenosa otopljene tvari, a samim time i brzinom otapanja.¹⁵



Slika 6. Shematski prikaz Danckwertovog modela

2.3.2. Razvoj i vrijednost testa oslobađanja

Ispitivanje brzine oslobađanja djelatne tvari je nezaobilazan alat tijekom razvoja formulacije, praćenja proizvodnog procesa i kontrole kvalitete lijekovitog pripravka, a pod određenim uvjetima može se koristiti i kao surogat za bioekvivalencijska ispitivanja.

Od 1960-ih takozvana „nova generacija“ farmaceutskih znanstvenika započela se baviti definiranjem kemijskih i matematičkih varijabli tehnologije čvrstih dozirnih oblika, njihovim kumulativnim učincima i značaju za *in vitro* i *in vivo* ponašanje doze. Prvi regulatorni propisi za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari pojavili su se 1970. godine, kada je u Američku farmakopeju po prvi put uključen test brzine oslobađanja u monografije za dvanaest oralnih lijekovitih pripravaka. Kod tih je prvih farmakopejskih testova korištena aparatura s košaricom, a nakon toga je uslijedio razvoj dodatnih aparatura za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari iz različitih dozirnih oblika (čvrstih oralnih, transdermalnih sustava, čvrstih lipofinih, guma za žvakanje, polučvrstih topikalnih pripravaka itd.) te njihovo usavršavanje i standardizacija.¹⁶

Testovi oslobađanja danas se koriste u farmaceutskoj industriji u širokom rasponu primjena; kako bi se ustvrdilo koje će formulacije dati najbolje rezultate u kliničkim ispitivanjima, potvrdilo puštanje proizvoda na tržište, provjerila reproducibilnost serije proizvoda, a mogu pomoći identificirati koje promjene u formulaciji ili proizvodnom procesu mogu utjecati na promjenu tijekom kliničkih ispitivanja. Također, mogu se koristiti i kako bi se utvrdilo može li se generička verzija lijeka odobriti ili ne.¹⁶ Danas su metode i uređaji za ispitivanje oslobađanja iz pojedinih dozirnih (prvenstveno oralnih) oblika standardizirani gotovo na globalnoj razini, u okviru tekućeg procesa harmonizacije farmaceutskih regulatornih zahtjeva.¹¹

Metode za karakterizaciju oslobađanja lijekova iz oralnih farmaceutskih proizvoda su se znatno razvile od njihovog prvotnog uvođenja kao alata za kontrolu kvalitete. Iako klasične metode kontrole kvalitete mogu detektirati varijacije u proizvodnim procedurama, one mogu, ali i ne moraju biti relevantne za *in vivo* ponašanje lijeka. U posljednjih 20 – 25 godina stekao se bolji uvid u samu gastrointestinalnu fiziologiju iz farmaceutske perspektive, pa je postalo moguće razviti biorelevantne metode koje mogu bolje pokazati kako se lijek ponaša *in vivo*. To je omogućilo i da se i *in vitro* metoda uskladi sa složenijim i inovativnijim oblicima poput farmaceutskih alternativa koje se razvijaju kako bi se zadovoljile potrebe razvoja modernih lijekova.²¹

2.3.3. Ispitivanje oslobađanja iz čvrstih oralnih dozirnih oblika

U Europskoj i Američkoj farmakopeji¹⁸ opisane su četiri aparature za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari iz čvrstih oralnih pripravaka (Slika 7):

1. Aparatura s košaricom

Aparatura se sastoji od cilindrične posude s hemisferičnim dnom, izrađene od stakla ili nekog drugog inertnog i prozirnog materijala te miješala s cilindričnom košaricom izrađenog od nehrđajućeg čelika. Pripravak se unosi u košaricu prije pokretanja testa. Rotacijom miješala oko svoje osi postiže se miješanje medija u posudi.

2. Aparatura s lopaticom

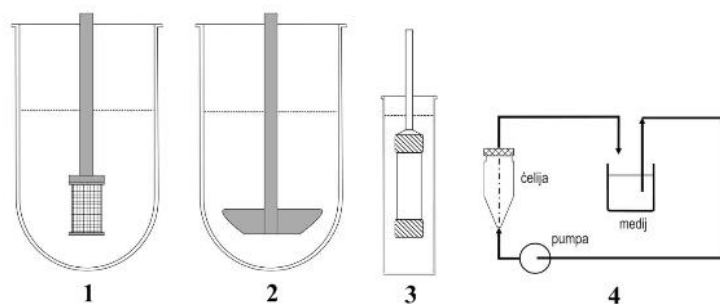
Aparatura se sastoji od cilindrične posude s hemisferičnim dnom, izrađene od stakla ili nekog drugog inertnog i prozirnog materijala te miješala s lopaticom izrađenog od nehrđajućeg čelika. Pripravak se unosi u posudu s medijem. Rotacijom miješala oko svoje osi postiže se miješanje medija u posudi.

3. Aparatura s uranjajućim cilindrom

Aparatura se sastoji od cilindrične staklene posude ravnog dna i staklenog cilindra s poklopcima. Pripravak se unosi u stakleni cilindar. Cilindar se pomiče po vertikalnoj osi, uranja u posudu s medijem i na taj način se postiže miješanje medija.

4. Protočna ćelija

Aparatura se sastoji od protočne ćelije od inertnog i prozirnog materijala i pumpe koja medij tjera kroz ćeliju odozdo prema gore. Pripravak se unosi u ćeliju. Pulsirajućim pumpanjem medija kroz ćeliju postiže se miješanje medija.



Slika 7. Shematski prikaz aparatura za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari iz čvrstih oralnih dozirnih oblika¹¹

Farmakopejom su propisane točne dimenzije i dopuštena odstupanja za sve komponente aparature jer hidrodinamika unutar posude i geometrija aparature mogu imati značajan utjecaj na brzinu oslobađanja. Stalna temperatura u posudama ili ćelijama održava se pomoću vodene kupelji. Detaljno je opisan sam postupak provođenja testa (priprema aparature i medija, način unošenja pripravka, mjesto uzorkovanja) jer male razlike u postupku analize mogu dovesti do razlika u rezultatima. Stoga je standardizacija aparatura i metoda za ispitivanje oslobađanja od nužne važnosti.

2.4. *In vitro-in vivo* korelacije (IVIVK)

Razvoj i optimizacija formulacija je integrirani dio proizvodnje i marketinga za svaku farmaceutski aktivnu tvar, što je vremenski dugotrajan i skup proces. Optimizacija može zahtijevati promjene u sastavu formulacije, proizvodnom procesu, veličini opreme i proizvodnje. Ukoliko se te promjene odraze na promjenu u formulaciji, može se pojaviti potreba za ispitivanjem na zdravim dobrovoljcima koja bi dokazala da je nova formulacija bioekvivalentna staroj. Dakako, provedba takvih zahtjeva ne samo da zaustavlja prodor novog pripravka na tržište, već i povećava troškove procesa optimizacije. Zato bi bilo poželjno da je razvijen *in vitro* test koji može dati ispravne podatke o biodostupnosti, pa se razvija koncept i primjena *in vitro-in vivo* korelacija (IVIVK) za dozirne oblike.¹⁷

2.4.1. Povijesni razvoj IVIVK

Važnost testa oslobađanja i njegova poveznica s *in vivo* ponašanjem prepoznata je prije više od 100 godina, a 1895. godine Caspari²² je napisao: „...izgleda da je brzo djelovanje pojedinih lijekova značajno oslabljeno pri komprimiranju. Kompozicija svih komprimiranih tableta trebala bi biti takva da se lako podvrgnu raspadanju i otapanju u želucu.“ Evolucija metoda za ispitivanje oslobađanja i uspostavu poveznice između *in vitro* i *in vivo* ponašanja pričekala je dok se u 1950-ima nisu započele razvijati analitičke metode. U tom su razdoblju pod nadzorom bili vitaminski proizvodi i enterički obložene tablete, a neuspjesi u pravilnom raspadanju povezivani su s lošim kliničkim rezultatima. U 1970-ima započeli su se razvijati generički lijekovi i interes za povezivanjem *in vitro* oslobađanja i *in vivo* ponašanja se povećavao. Prva povezanost između brzine otapanja i apsorpcije za tablete digoksina²⁶ pokazana je 1973. godine, što je utrlo put razvoju IVIVK.²¹

U 1970-ima i 80-ima bilo je mnoštvo pokušaja uspostavljanja IVIVK za različite vrste lijekova, no ne i uspješnih, odnosno takvih da se granični parametri *in vitro* ispitivanja mogu koristiti za predviđanje *in vivo* oslobađanja i njegovu zamjenu. Ipak su farmaceutska industrija i regulatorne agencije ustrajale na razvoju ovog koncepta, organizirajući radionice i izlaganja o IVIVK. Tek su 1995. godine uključene u Američku farmakopeju, a potom su spomenute i u Europskim smjernicama. Proteklog desetljeća, IVIVK su se razvijale pretežito za dozirne oblike s kontroliranim oslobađanjem, što nije neočekivano s obzirom da oslobađanje određuje farmakokinetički profil. Razvijanjem dozirnih oblika s manje topljivim lijekovima prepoznato je i da se IVIVK, s obzirom da je otapanje često i prepreka za apsorpciju, mogu koristiti i za takve lijekove, čak i ako je proizvod namijenjen za „trenutačno“ oslobađanje.²¹

2.4.2. Definicija IVIVK

IVIVK se mogu definirati na dva načina koja su predložili USP (United States Pharmacopoeia) i FDA (U.S. Food and Drug Administration):

- IVIVK je uspostavljanje racionalnog odnosa između biološkog svojstva ili parametra izvedenog iz biološkog svojstva dozirnog oblika i fizikalno-kemijskog svojstva istog dozirnog oblika.¹⁸
- IVIVK je prediktivni matematički model koji opisuje odnos između *in vitro* svojstava dozirnog oblika i pripadnog *in vivo* odgovora. Općenito, *in vitro* svojstvo je brzina ili stupanj otpuštanja lijeka, dok je *in vivo* odgovor koncentracija lijeka u plazmi ili količina apsorbiranog lijeka.¹⁹

2.4.3. Matematički i računalni alati za razvoj korelacija

Za razvoj korelacija najprije su potrebni parametri dobiveni iz realnih podataka. Praćenjem onoga što tijelo radi aktivnoj tvari (lijeku, otrovu ili nutrijentu) razvila se grana farmakologije pod nazivom *farmakokinetika* (eng. *pharmacokinetics* – PK) koja proučava apsorpciju tvari, odnosno kemijskog spoja u krv, njenu raspodjelu u tjelesnim tekućinama i tkivima, metabolizam i izlučivanje lijeka što se opisuje skraćenicom ADME (eng. *Absorption, Distribution, Metabolis and Excretion*). PK analiza temelji se na praćenju vremenske

promjene koncentracije spoja u krvnoj plazmi nakon administriranja u određenoj dozi na određen način, pa se iz ovisnosti koncentracije o vremenu određuju PK parametri:²⁵

- Površina ispod krivulje AUC (eng. *Area Under Curve*) – opseg apsorpcije i sistemske raspoloživosti lijeka. Uzima se da je lijek koji se daje direktno u venu ujedno i 100 % raspoloživ.
- Biodostupnost – sistemski dostupan udio lijeka koji se daje oralno u odnosu na direktnu vensku primjenu.
- c_{\max} – najveća koncentracija lijeka u plazmi nakon primjene.
- t_{\max} – vrijeme postizanja c_{\max} .
- Klirens (CL) – volumen krvne plazme očišćen od lijeka u jedinici vremena.
- Volumen raspodjele (V_d) – prividni/hipotetski volumen tijela u koji se djelatna tvar raspodijelila.
- k_e – konstanta brzine eliminacije lijeka.
- Poluvijek eliminacije – $t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_e} \sim \frac{V_d}{CL}$

Pristup uspostavljanju IVIVK uključuje potrebu za predviđanjem profila koncentracije u plazmi za svaku formulaciju, korištenjem c_{\max} i/ili AUC podataka o oslobađanju pojedine formulacije koja se koristi za razvoj modela. Brzine otapanja *in vitro* dobivaju se iz podataka o oslobađanju i pretvaraju u brzine otapanja *in vivo* primjenom nagiba i stupnja preklapanja na IVIVK modelu (Slika 8). Ako je profil kumulativnog oslobađanja lijeka sigmoidalan, tada se može upotrijebiti Hillova jednadžba za dobivanje parametara *in vitro* oslobađanja kako slijedi:¹⁷

$$\% \text{ Oslobođenog lijeka u vremenu} = \frac{D_{\max} \cdot t^\gamma}{D_{50}^\gamma + t^\gamma} \quad (2)$$

pri čemu je D_{\max} – vrijeme postizanja maksimuma oslobođenog lijeka, D_{50} – vrijeme potrebno za otpuštanje 50 % lijeka, t – vrijeme a γ – faktor sigmoidalnosti. *In vitro* količine oslobađanja tada se računaju prvom derivacijom Hillove jednadžbe:

$$R_{dis} = \frac{d\%D}{dt} = \frac{\gamma D_{\max} D_{50}^\gamma t^{\gamma-1}}{(D_{50}^\gamma + t^\gamma)^2} \quad (3)$$

Općenito, postotak apsorbiranog lijeka može se izračunati pomoću modela kao što su Wagner-Nelsonov postupak ili Loo-Riegelmanova metoda, ili pak numeričkom

dekonvolucijom neovisnom o modelu. Prema Wagner-Nelsonovoj metodi, kumulativni udio lijeka apsorbiranog u vremenu t izračunava se iz jednadžbe kako slijedi:

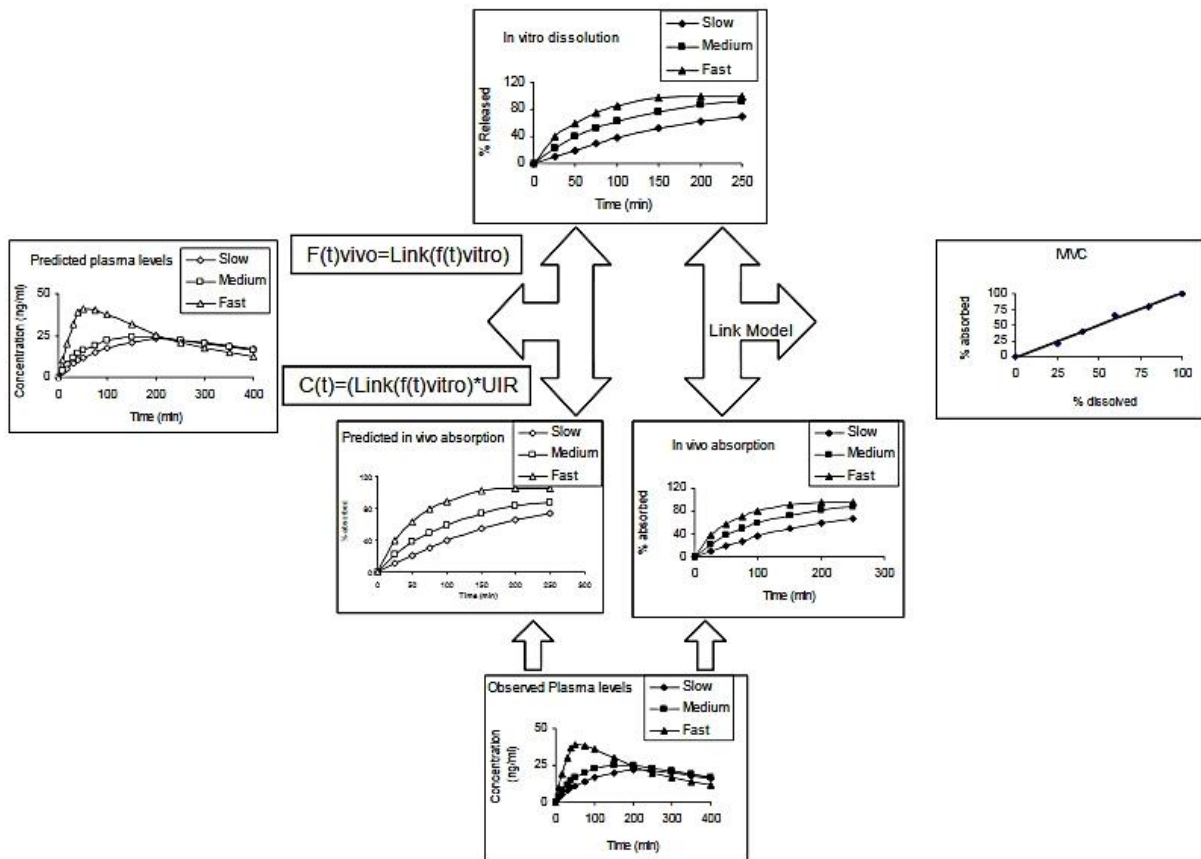
$$F_T = \frac{c_t + k_e \int_0^t c dt}{k_e \int_0^\infty c dt} \quad (4)$$

pri čemu je k_e konstanta brzine eliminacije lijeka koja se koristi za opisivanje brzine kojom se lijek uklanja iz sustava.

Loo-Riegelmanova metoda zahtijeva podatke ovisnosti koncentracije lijeka o vremenu za oralni i intravenozni dozirni oblik istog lijeka, pa se udio apsorbiranog lijeka u vremenu računa:

$$F_T = \frac{c_t + k_{10} \int_0^t c dt + \frac{(X_p)_t}{V_c}}{k_{10} \int_0^\infty c dt} \quad (5)$$

pri čemu je $(X_p)_t$ udio lijeka u perifernom dijelu kao funkcija vremena nakon oralne primjene, a V_c prividni volumen središnjeg odjeljka. Konstanta brzine uklanjanja lijeka iz središnjeg odjeljka k_{10} procjenjuje se iz prethodnog ili sljedećeg intravenoskog ispitivanja istog ispitanika.



Slika 8. Shematski prikaz profila koji se koriste za razvoj i potvrđivanje IVIVK¹⁷

Predviđanje koncentracija u plazmi iz odgovarajućih *in vivo* profila dobiva se konvolucijom *in vivo* oslobađanja i farmakokinetičkog modela za tzv. impulsni odgovor koji se dobiva iz podataka oralne otopine ili *in vivo* doziranja oblika s trenutnim oslobađanjem, koristeći jednadžbu:

$$c(t) = \int_0^t c_{\delta}(t-u)r_{abs}(u)du \quad (6)$$

gdje c_{δ} predstavlja profil koncentracije u vremenu koji je posljedica trenutne apsorpcije jedinične količine lijeka, r_{abs} je brzina unosa čvrstog dozirnog oblika u tijelo, a u varijabla integracije.

Model koji predviđa biorasploživost tada se uspoređuje s određenom biorasploživošću za svaki pripravak. Postotak pogreške za c_t , c_{max} ili AUC može se utvrditi na sljedeći način:

$$\text{Postotak pogreške} = \frac{(\text{promatrani parametar} - \text{predviđeni parametar}) \cdot 100}{\text{predviđeni parametar}} \quad (7)$$

2.4.4. Razine korelacija

Termin *korelacija* često se upotrebljava u farmaceutskim i srodnim znanostima kako bi se opisao odnos koji postoji između varijabli. Matematički, pojam korelacija znači međuovisnost kvantitativnih i kvalitativnih podataka ili mjerljivih varijabli i funkcija.²⁰ S farmaceutskog stajališta, korelacija bi se mogla nazvati odnosom odgovarajućih *in vitro* karakteristika otpuštanja i *in vivo* parametara biorasploživosti.

Koncept razina korelacije temelji se na mogućnosti korelacije da prikaže ovisnost koncentracije lijeka u plazmi u ovisnosti o vremenu, stoga je FDA definirala pet razina korelacije:

- Razina A korelacije

Ova razina korelacije najviša je kategorija korelacije i predstavlja odnos između dvije točke (podatka) brzine otpuštanja *in vitro* i stope unosa lijeka iz dozirnog oblika. Svrha korelacije razine A je definiranje izravne veze između *in vivo* podataka tako da je samo mjerenje brzine oslobađanja *in vitro* dovoljno za određivanje biofarmaceutske brzine dozirnog oblika.¹⁷ Nakon ispravne validacije, IVIVK predviđa *in vivo* biorasploživost, a simulacija odražava *in vivo* ponašanje različitih formulacija. Korelacija ovog tipa je općenito linearna, pa ulazne krivulje

možu biti izravno ponovljive ili izražene na način da se nadgledaju upotrebom faktora skaliranja. Nelinearne korelacije se, iako neuobičajene, mogu također primjeniti.²⁴

U određenim slučajevima, posebno za formulacije s trenutnim oslobađanjem, test oslobađanja može služiti ne samo kao kontrola kvalitete procesa proizvodnje, već i kao pokazatelj uspješnosti formulacije.²⁴ U slučaju uspješne korelacije razine A, *in vitro* krivulja oslobađanja može poslužiti i kao surogat za *in vivo* ispitivanje ponašanja. Stoga sama promjena na mjestu ili načinu proizvodnje, opskrbi sirovinama ili manje izmjene formulacija, pa čak i mijenjanje jačine proizvoda korištenjem iste formulacije može biti opravdano bez potrebe za dodatnim istraživanjima na ljudima.

- Razina B korelacije

IVIVK razine B koristi principe statističke analize trenutka. U ovoj razini, prosječno vrijeme otapanja *in vitro* (MDT_{vitro}) proizvoda uspoređuje se s prosječnim *in vivo* boravkom (MDT) ili srednjim vremenom otapanja *in vivo* (MDT_{vivo}).

Iako su u korelaciji razine B korišteni svi podaci *in vitro* i *in vivo*, ne smatra se korelacijom dvije točke, jer postoji niz različitih *in vivo* krivulja koje će proizvesti različite slične srednje vrijednosti vremena zadržavanja.¹⁹ Korelacija stoga ne odražava jednoznačne *in vivo* krivulje razine koncentracije u plazmi i pri razvoju se ne može osloniti na korelaciju razine B kako bi se opravdala izmjena formulacije, mjesta proizvodnje, promjena pomoćnih tvari, niti za opravdanje standarda kontrole kvalitete.¹⁸

- Razina C korelacije

U ovoj razini korelacije uspoređuje se jedna točka u vremenu ($t_{50\%}$, $t_{90\%}$ itd.) s jednim srednjim farmakokinetičkim parametrom (AUC, t_{max} ili c_{max}) koji predstavljaju korelaciju u jednoj točki, a ne cijeli oblik krivulje koncentracije lijeka u plazmi, što je presudan faktor učinkovitosti proizvoda s kontroliranim oslobađanjem. Ovo je najslabija razina korelacije, jer je uspostavljen djelomični odnos između apsorpcije i otapanja. Zbog toga je korisnost korelacije razine C ograničena u predviđanju *in vivo* djelovanja lijeka, a njena ograničenja u primjeni slična su kao kod razine B korelacija. Ipak, korelacija razine C može biti korisna u ranim fazama razvoja, kada se odabiru pilot formulacije. Iako bi informacije mogle biti korisne u razvoju, odricanje *in vivo* studije bioekvivalencije nije moguće.¹⁹

- Višestruka korelacija razine C

Višestruka korelacija razine C odnosi se na jedan ili više farmakokinetičkih parametara od interesa (c_{\max} , AUC ili neki drugi) i količinu oslobođenog lijeka u nekoliko vremenskih točaka profila oslobađanja. Korelacija više točaka može se koristiti za opravdanje izostanka *in vivo* bioekvivalencije, pod uvjetom da je uspostavljena povezanost u cijelom profilu oslobađanja s jednim ili više farmakokinetičkih parametara od interesa. U svakom trenutku potrebno je ukazati na odnos istog parametra, tako da se može procijeniti *in vivo* učinak bilo koje promjene pri oslobađanju.¹⁹ Ako je moguće postići ovu razinu korelacije, tada je vrlo vjerojatan i razvoj korelacije razine A. Višestruka korelacija razine C trebala bi se temeljiti na najmanje tri vremenske točke oslobađanja koje pokrivaju ranu, srednju i kasnu fazu profila oslobađanja.

- Razina D korelacije

Korelacija razine D je redni poredak i kvalitativna analiza, te se ne smatra korisnom u regulatorne svrhe. To nije formalna korelacija, ali služi kao pomoć u razvoju formulacije ili u postupku obrade.¹⁹

PK parametri koji se koriste za uspostavljanje različitih razina korelacija prikazani su Tablicom 3.

Tablica 3. Parametri i podaci potrebni za razvoj IVIVK ovisno o razini korelacije²⁴

Razina	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
A	Krivulja oslobađanja	Ulazne apsorpcijske krivulje
B	Statistički momenti: MDT	Statistički momenti: MRT, MAT itd.
C	Vrijeme oslobađanja ($t_{10\%}$, $t_{50\%}$, $t_{90\%}$), stupanj oslobađanja, učinkovitost otapanja	c_{\max} , t_{\max} , k_e , AUC, $t_{10\%}$, $t_{50\%}$, $t_{90\%}$

2.4.5. Važnost IVIVK

Regulatorni okviri za dozirne oblike razvijeni su od strane FDA kako bi se minimizirala potreba za ispitivanjem biodostupnosti. Kako oralni dozirni oblici nastavljaju biti oblici više od polovine novih lijekova, *in vitro* alati za predviđanje *in vivo* ponašanja imaju glavnu ulogu

za razvoj i uspostavljanje efektivnog procesa razvoja lijekova. Novi biofarmaceutski alati mogu omogućiti:

- sprječavanje krivih odbacivanja spojeva u pretkliničkoj razvojnoj fazi zbog nedostatka odgovarajuće identifikacije problema s oslobađanjem lijeka iz dozirnog oblika u gastrointestinalnom traktu,
- omogućavanje razvojnih opcija u pretkliničkoj fazi za potporu dozirnom obliku u slučaju potrebe za poboljšanjem formulacije,
- realniju procjenu licenciranih spojeva,
- procjenu potrebe i potencijala za dozirne oblike s kontroliranim oslobađanjem,
- smanjenje potrebe za ispitivanjima na životinjama i ljudima te smanjenje rizika od neuspjeha pri ispitivanju bioekvivalencije,
- testove kontrole kvalitete koji su klinički relevantniji i na taj način nude mogućnosti za ekonomičniju proizvodnju,
- validaciju *in vitro* metoda za test oslobađanja.

Razvoj IVIVK uključuje cjelovit proces razvoja korelacije visoke kvalitete, točne i precizne predvidljivosti.¹⁷ Idealan *in vitro* test bio bi onaj koji uzima u obzir sve aspekte *in vivo* kompleksnosti koji mogu utjecati na otpuštanje lijeka i njegovu apsorpciju, a ujedno i tako jednostavan da se može koristiti i u razvoju i kao test kontrole kvalitete za gotovi proizvod. Ipak, nije moguće kombinirati oba slučaja u samo jednom testu. Zbog toga metode koje se koriste u razvoju moraju biti povezane sa samim proizvodom i specifičnim rizicima povezanim s njim te se razvijati sukladno napredovanju samog procesa razvoja.²¹

Rezultati testa oslobađanja su korisni za kvalitativna, u nekim slučajevima i kvantitativna predviđanja *in vivo* ponašanja, no ipak ne mogu obuhvatiti sve procese koji utječu na biodostupnost, kao što su pražnjenje želuca, propusnost crijevne membrane, vrijeme zadržavanja, pH i volumen tekućine u svakom dijelu gastrointestinalnog trakta ili izlučivanje. Kako bi se povezali svi utjecaji, rezultati *in vitro* testa oslobađanja mogu se kombinirati s *fiziološki temeljenim farmakokinetičkim modelima* (eng. *physiologically based pharmacokinetics* – PBPK).²¹ Kombiniranje testa oslobađanja i PBPK modela može služiti kao surogat za *in vivo* procjenu, što otvara mogućnost uspostavljanja kompletnog *in vivo* profila koncentracije u plazmi. Koncept PBPK modeliranja temelji se na opisivanju koncentracijskog profila lijeka u različitim tkivima i krvi tijekom vremena s obzirom na karakteristike lijeka, vrijeme i način oslobađanja te fiziološke procese kojima je lijek izložen.

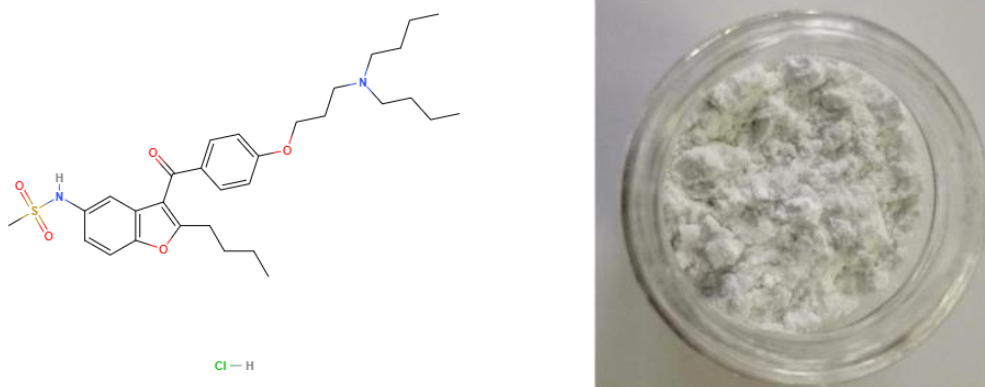
Parametri za modeliranje se određuju iz *in vitro* eksperimenata i fiziologije, koristeći *in silico* predviđanja *in vivo* podataka.²³ Ovakav pristup može biti zanimljiv alat za razvoj proizvoda s obzirom da nudi način povezivanja *in vitro* ispitivanja i kliničkog ponašanja.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Za izradu *in vitro-in vivo* korelacija farmaceutskih alternativa dronedaron-hidroklorida pripravljene su četiri vrste dozirnih oblika različitih karakteristika i tehnologija izrade. Oslobođanje dronedarona iz dozirnih oblika ispitano je metodom *in vitro*, a potom su računalnim simulacijama predviđena *in vivo* ponašanja i izrađene korelacije.

3.1. Dronedaron-hidroklorid

Dronedaron-hidroklorid je derivat benzofurana vezanog na amiodaron, u farmaceutskoj industriji poznat kao lijek za liječenje srčane aritmije. Kemijski naziv dronedarona je N-(2-butyl-3-(p-(3-(dibutylamino)propoksi)benzoi)-5-benzofuranil) metan sulfonamid. Njegova molekulska formula je $C_{31}H_{45}ClN_2O_5S$ (Slika 9, lijevo). Molekulska masa dronedaron-hidroklorida iznosi 593,22 g/mol, a gustoća 1143 kg/m^3 . Pri sobnoj temperaturi je bijeli prah (Slika 9, desno), a topljiv je pri temperaturama od 141 do $143 \text{ }^\circ\text{C}$.³⁴



Slika 9. Struktura i izgled DNR

Proizvođač djelatne tvari je PLIVA Hrvatska d.o.o.

3.2. Farmaceutske alternative dronedaron-hidroklorida

3.2.1. Pelete

Pelete su jedan od najpopularnijih višestrukih sustava za doziranje lijekova. Proizvode se aglomeriranjem sitnih prašaka djelatne tvari u male sferične ili polusferične čestice veličine od 0,05 mm do 2 mm. Višestručna priroda peleta pruža važne terapijske, farmakološke i tehnološke prednosti u odnosu na konvencionalne oblike doziranja, kao što su predvidljivo

oslobađanje lijeka, smanjenje rizika od prebrzog ili predugačkog oslobađanja lijeka, raznolikost profila oslobađanja te povećana bioraspoloživost uz manja odstupanja između *in vitro* i *in vivo* ispitivanja.²⁷

Pelete su pripremljene u okviru diplomskog rada studentice Mateje Štanfel.²⁸

Materijali korišteni pri izradi peleta su:²⁸

- Dronedaron-hidroklorid, korišten kao modalni lijek nanošen na pelete impregnacijom u vakuumu i direktnim ugrađivanjem u pelete. Pripremljen je u obliku nanosuspenzije mljevenjem u vodenom mediju pomoću mlina Dyno-mill Research Lab (WAB, Švicarska).
- Mikrokrystalna celuloza (MCC), celulozni materijal visokog stupnja kristaličnosti koji ima ulogu prirodnog stabilizatora. To je sipki, bijeli prah, bez okusa i mirisa, lako se preša pa se stoga koristi kao nosač lijekova u tabletama. Za pripravu peleta korišten je Avicel PH 101 (mikrokrystalna celuloza) dobiven od tvrtke Pliva Hrvatska d.o.o.
- Natrijev klorid (NaCl), dodan kao sredstvo za formiranje pora.
- Hidroksipropil-metil-celuloza (HPMC) korištena kao sredstvo za oblaganje peleta. Pripada skupini celuloznih etera u kojima su hidroksilne skupine suspsitirane s jednom ili više od tri hidroksilne grupe prisutne u celuloznom prstenu. HPMC je hidrofilan, biorazgradiv i biokompatibilan polimer koji ima široku primjenu u proizvodnji lijekova.
- Poli(etilen-glikol) (PEG) u ulozi veziva pri izradi peleta, korišten kako bi se olakšalo oblikovanje mješavine s djelatnom tvari.

3.2.1.1. Priprava impregniranjem

Pelete su pripravljene pomoću dvije različite metode. Impregirane pelete pripravljene su miješanjem Avicela PH 101 i NaCl u masenom omjeru 30:70, nakon čega je mješavina miješana u smičnom granulatoru pri brzini miješala od 200 o/min tijekom 2 minute.²⁸

Destilirana voda (u masenom udjelu od 42 %) dodana je kao vezivno sredstvo. Brzina sjekača tijekom miješanja i dodavanja veziva bila je 500 o/min, a nakon dodatka veziva povećana je na 750 o/min. Sjekačem je regulirana veličina nastalih granula koje su po završetku procesa prosijane kroz otvor očice sita od 2 mm kako bi se dobile ujednačene veličine granula.²⁸

150 do 200 grama pripremljenih granula ekstrudirano je u aksijalnom ekstruderu MG-55 (*Fuji Paundal, Japan*) (Slika 10, lijevo) pri brzini od 50 o/min i sobnoj temperaturi, te je protisnuto kroz otvore promjera 1 mm. Dobiveni ekstrudat sferoniziran je 2 minute u sferonizatoru QJ-230T-1 (*Fuji Paundal, Japan*) (Slika 10, desno) pri 1000 o/min kako bi se dobile pelete sferičnog oblika. Nakon sferoniziranja vlažne pelete sušene su 24 sata pri sobnoj temperaturi.



Slika 10. Ekstruder (lijevo) i sferonizator (desno)²⁸

Porozna struktura peleta postignuta je ispiranjem NaCl iz inertnih peleta destiliranom vodom. Pelete su najprije potopljene 24 sata u destiliranoj vodi, a nakon toga ispirane pomoću Büchnerovog lijevka. Uklanjanje klorida provjereno je dodatkom nekoliko kapi 0,25 M AgNO₃ u filtrat koji u prisustvu klorida stvara bijeli talog (AgCl). U slučaju pojave taloga, pelete su dodatno ispirane destiliranom vodom. Isprane pelete sušene su 48 sati pri sobnoj temperaturi i nakon toga odvojene na sitima u rasponu veličina 500 – 1250 µm.²⁸

Nanošenju dronedaron-hidroklorida vakuumskom impregnacijom prethodilo je mljevenje u mlinu Dyno-mill Research Lab (*WAB, Švicarska*) komore volumena 300 mL (Slika 11). Uzorak je pripremljen u masenim omjerima: 20 % dronedaron-hidroklorida, 1 % stabilizatora (Poloxamer 407) i 79 % destilirane vode. Uzorak je homogeniziran prije samog mljevenja pomoću propelerske miješalice pri 700 o/min. Uređaj za mljevenje sastoji se od komore za mljevenje, osovine i recirkulirajuće komore. Komora za mljevenje puni se medijem za mljevenje (kuglicama), vodom, djelatnom tvari i stabilizatorima. Mljevenje se odvija pri strogo kontroliranim temperaturnim uvjetima dok kuglice rotiraju velikom brzinom. Velike sile trenja i udara omogućavaju visok stupanj usitnjavanja. Prilikom mljevenja korišteno je 5 mL keramičkih kuglica (ZY-P), veličine 0,1 – 0,2 mm pri 4000 o/min i temperaturi od 40 °C.²⁸



Slika 11. Mlin Dyno-mill Research Lab (*WAB, Švicarska*)²⁸

Kako bi se omogućilo potpuno prodiranje nanosuspenzije dronedarona u pore peleta, provedena je impregnacija pod vakuumom u uređaju Cito Vac (*Struers, Njemačka*) (Slika 12).



Slika 12. Uređaj za vakuumsku impregnaciju Cito Vac (*Struers, Njemačka*)²⁸

Uzorci peleta stavljeni su u staklenu posudu, postavljeni u komoru uređaja i vakuumirani. Nakon postizanja vakuuma, nanosuspenzija dronedarona propuštena je u staklenu posudu do potpunog prekrivanja peleta. Vakuumiranje je zaustavljeno kako bi tlak zraka potisnuo otopinu dronedarona u pore peleta, a nakon nekoliko minuta tlak je vraćen na atmosferski. Nakon impregniranja, višak suspenzije je dekantiran i pelete su stavljene na sušenje 24 sata pri sobnoj temperaturi.²⁸

3.2.1.2. Priprava direktnim ugrađivanjem

Pelete označene kao 100 i 400 mg pripravljene su direktnim ugrađivanjem dronedaron hidroklorida u pelete mikrokristalne celuloze tijekom procesa ekstrudiranja, a potom su sferonizirane.

Za pripravu peleta 100 mg DNR, vezivno sredstvo PEG 4000, u masenom omjeru 8,4 %, otopljeno je u destiliranoj vodi pomoću magnetske miješalice. Nakon toga je pripravljena mješavina Avicela PH 101 masenog udjela 76,6 % i 15 % DNR te miješana 2 minute u

smičnom granulatoru pri brzini miješala od 200 o/min. PEG 4000 otopljen u vodi dodan je u mješavinu. Brzina sjekača tijekom miješanja i dodavanja veziva bila je 500 o/min, a nakon dodatka veziva povećana je na 750 o/min. Kako bi se dobile ujednačene veličine granula, granule su po završetku procesa prosijane kroz otvor očice sita od 2 mm. Pripremljene granule ekstrudirane su u aksijalnom ekstruderu MG-55 (*Fuji Paundal, Japan*) pri brzini od 50 o/min i sobnoj temperaturi, te su protisnute kroz otvore sita promjera 1 mm. Dobiveni ekstrudat sferoniziran je 2 minute u sferonizatoru QJ-230T-1 (*Fuji Paundal, Japan*) pri 1000 o/min kako bi se dobile sferične pelete. Dobivene pelete sušene su 24 sata pri sobnoj temperaturi i nakon toga odvojene na sitima u rasponu veličina 500 – 1250 μm .²⁸

Pelete 400 mg DNR dobivene su miješanjem Avicela PH 101 masenog udjela 38,65 % i 57,15 % DNR u smičnom granulatoru pri brzini miješala od 200 o/min. PEG 4000 masenog udjela 4,2 % otopljen je u destiliranoj vodi te dodan kao vezivno sredstvo. Brzina sjekača tijekom miješanja i dodavanja veziva bila je 500 o/min, a nakon dodatka veziva povećana je na 750 o/min. Dobivene granule protisnute su kroz otvor očice sita od 2 mm. Pripremljene granule ekstrudirane su u aksijalnom ekstruderu MG-55 (*Fuji Paundal, Japan*) pri brzini od 50 o/min i sobnoj temperaturi, te su protisnute kroz otvore sita promjera 1 mm. Dobiveni ekstrudat sferoniziran je 2 minute u sferonizatoru QJ-230T-1 (*Fuji Paundal, Japan*) pri 600 o/min kako bi se dobile sferične pelete. Dobivene pelete sušene su 24 sata pri sobnoj temperaturi nakon čega su odvojene na sitima u rasponu veličina 500 –1250 μm .²⁸

3.2.1.3. Oblaganje peleta

Objekte vrste peleta oblagane su vodenom otopinom HPMC, masenog udjela 5 % uz dodatak bojila kako bi se vizualizirala obloga. Oblaganje je provedeno u fluidiziranom sloju uz dodatak Wursterove cijevi u uređaju UniGlatt (*Glatt GmbH, Njemačka*) (Slika 13). Uzorak peleta volumena 140 mL stavlja se u komoru uređaja te se podešava ulazna struja zraka kako bi čestice peleta fluidizirale. Temperatura u komori bila je 80 °C, a tlak zraka za raspršivanje veziva 1,5 bar. Otvor mlaznice je podešen tako da je vrh otvoren za 2 okretaja. Vezivo se do mlaznice dovodi peristaltičkom pumpom i raspršuje u komoru u kojoj fluidiziraju pelete. Protok otopine za oblaganje iznosio je 6,5 mL/min. Oblaganje se odvija u ciklusima: 30 s doziranje veziva, 2 min sušenje. Pelete su oblagane kroz 60 ciklusa.²⁸



Slika 13. UniGlatt uređaj za oblaganje u fluidiziranom sloju (*Glatt GmbH, Njemačka*)²⁸

3.2.2. 3D tiskane tablete

Primjenom *aditivne proizvodnje* (eng. *Additive Manufacturing – AM*) u industriji lijekova moguće je proizvesti tabletu s određenom dozom lijeka koja je potrebna za pojedinog pacijenta. Pod pojmom AM podrazumijeva se proizvodnja računalno dizajniranih trodimenzionalnih predmeta nanošenjem materijala sloj po sloj.

Rezultati za 3D tiskane tablete preuzeti su iz diplomskog rada studentice Kristine Kezerić.²⁹

Materijali korišteni za izradu 3D tableta su:²⁹

- Poli(etilen-glikol) (PEG), biološki inertan polimer molekulske formule $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$. PEG je netoksičan, topljiv u vodi i vrlo elastičan zbog čega se često koristi kao plastifikator. Korišten je PEG molarne mase 20 000 g/mol proizvođača *Merck KgaA*.
- Poli(vinil-alkohol) (PVA), sintetički polimer molekulske formule $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$. Topljiv je u vodi, biorazgradiv, te nije otrovan ni kancerogen zbog čega se često koristi u farmaceutskoj industriji. Korišten je PVA-filament proizvođača *Formfutura BV*.
- Dronedaron-hidroklorid (DNR) kao modelna djelatna tvar koja je dodana u filament.

Kako bi se dobio filament pogodan za izradu tableta napravljena je mješavina u PEG (10 % mas.), DNR (10 % mas.) i PVA-filamenta (80 % mas.), u obliku čvrste disperzije i mase 30 g. Čvrsta disperzija napravljena je zagrijavanjem PEG-a do rastaljenog stanja, nakon čega je dodana odgovarajuća količina praškastog DNR, pri čemu nastaje vrlo viskozna mješavina. Nakon što je postignuta jednolika izmiješanost, zagrijavanje je prekinuto, a mješavina hlađena na sobnoj temperaturi. Nastala čvrsta disperzija usitnjena je do željene veličine čestica i

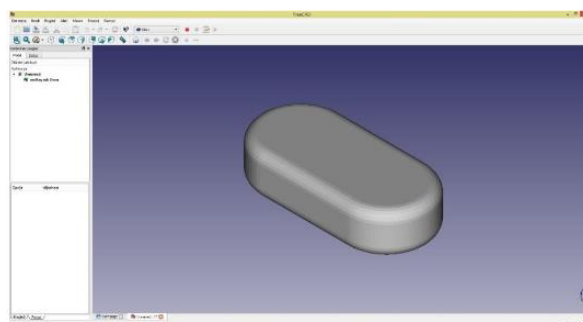
pomiješana s odgovarajućom količinom PVA komercijalnog filameta narezanog na komadiće.²⁹

Za ekstrudiranje taljenjem korišten je pužni ekstruder *Noztek Pro*, promjera dize 1,75 mm (Slika 14). Filamenti su dobiveni pri temperaturi 170 °C uz broj okretaja puža 60 o/min.



Slika 14. Ekstruder *Noztek Pro*²⁹

Model tablete dizajniran je u programu *FreeCAD 0.16.6706* (Slika 15). Dimenzije tablete odabrane su tako da budu bliske dimenzijama komercijalne tablete (*Multaq*[®], *Sanofi Aventis*): duljine 17,60 mm, širine 8,20 mm i visine 6,48 mm. Nakon izrade CAD modela potrebno je pretvoriti ga u STL format kako bi se model mogao koristiti u programu 3D printera.²⁹

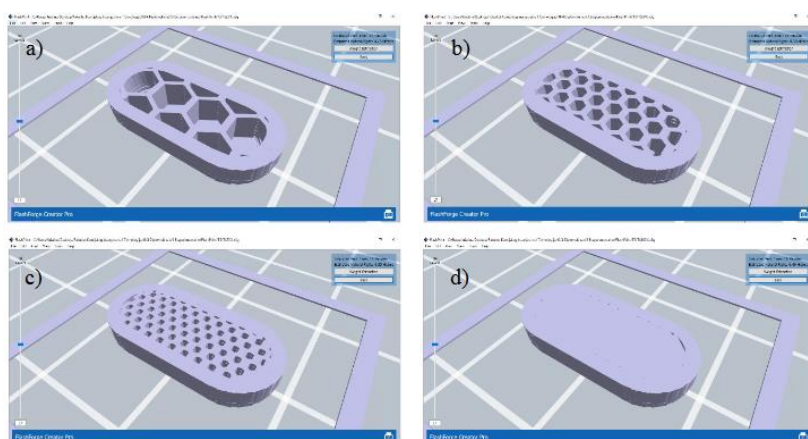


Slika 15. Model tablete u programu *FreeCAD*²⁹

Za podešavanje postavki 3D printera korišten je program *FlashPrint*, u kojem se mogu koristiti samo STL datoteke koje predočavaju model sloj po sloj. Podešene su sve željene postavke tiskanja tablete, prikazane tablicom 4. Za 3D tiskanje korišteni su pripravljeni filamenti, a tablete su tiskane s različitim gustoćama ispune. Korištene su četiri različite gustoće ispune: 25, 50, 75 i 100 % (Slika 16).

Tablica 4. Postavke 3D printera za tiskanje tableta²⁹

Uvjeti printanja	Specifikacije
Rezolucija	Visoka
Podloga	DA (PVA)
Visina sloja [mm]	0,20
Visina prvog sloja [mm]	0,20
Donji slojevi	2
Gornji slojevi	2
Gustoća ispune [%]	25/50/75/100
Uzorak ispune	Heksagon
Brzina tiskanja [mm/s]	10
Brzina gibanja mlaznice [mm/s]	20
Temperatura ekstrudera [°C]	190/185
Temperatura podloge [°C]	40
Vrijeme tiskanja [min]	15/16/17/19



Slika 16. Prikaz različitih gustoća ispune tableta u programu *FlashPrint*²⁹

a) 25 %, b) 50 %, c) 75 %, d) 100 %

Za ispis tableta korišten je 3D printer *FlashForge Inventor* (Slika 17) pomoću kojeg su dobivene tablete metodom taložnog srašćivanja (FDM), koja se temelji na taljenju termoplastičnog filameta u ekstruderu 3D printera i istiskivanju rastaljenog materijala kroz mlaznicu na radnu podlogu, a predmet nastaje nanošenjem sloja na sloj.³⁰



Slika 17. 3D printer *FlashForge Inventor*

3.2.3. 3D tiskane kapsule

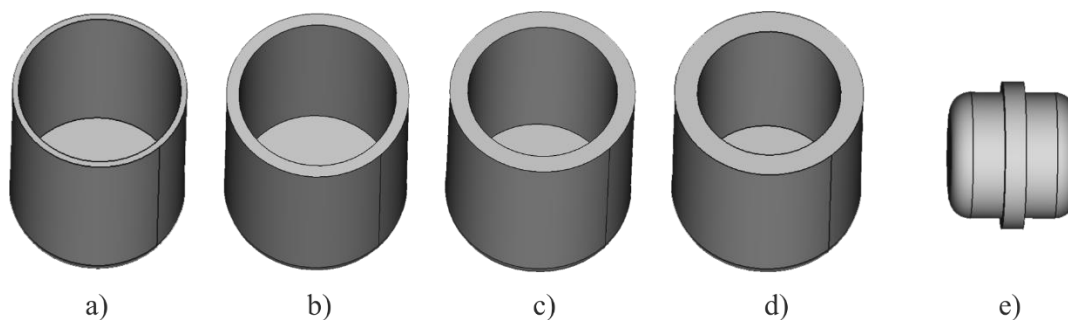
Aditivna proizvodnja omogućuje proizvodnju predmeta različitih oblika i dimenzija, stoga je, uz tablete, ispitano i ponašanje kapsula kao dozirnih oblika. Tijek pripreme kapsula sličan je onom opisanom u poglavlju 3.2.2. 3D tiskane tablete.

Kapsule su izrađene u okviru doktorske disertacije Matije Gretića, mag. ing. cheming.

Materijali korišteni za izradu 3D kapsula su:²⁹

- Poli(vinil-alkohol) (PVA), sintetički polimer molekulske formule $(C_2H_4O)_n$. Topljiv je u vodi, biorazgradiv, te nije otrovan ni kancerogen zbog čega se često koristi u farmaceutskoj industriji. Korišten je PVA-filament proizvođača *Formfutura BV*.
- Dronedaron-hidroklorid (DNR) kao modelna djelatna tvar koja je dodana u filament.

Prilikom dizajna kapsula mijenjana je debljina opne kako bi se postigla kontrola oslobađanja djelatne tvari. Kapsule se sastoje od dva dijela koji su međusobno spojeni spojnicom prikazanom na slici 18e.



Slika 18. Modeli 3D tiskanih kapsula; opne a) 0,25 mm, b) 0,50 mm, c) 0,75 mm, d) 1,00 mm te e) spojnica

Za ispis kapsula korišten je 3D printer *FlashForge Inventor* (Slika 17). Uvjeti tiska dani su u tablici 5.

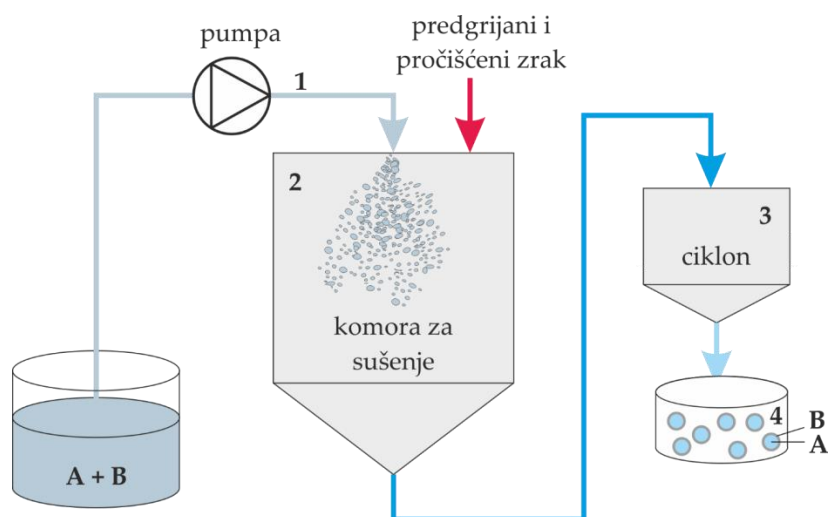
Tablica 5. Postavke 3D printera za tiskanje kapsula

Uvjeti printanja	Spojnica	Poklopac
Rezolucija	Visoka	Visoka
Visina sloja [mm]	0,12	0,05
Visina prvog sloja [mm]	0,20	0,10
Gustoća ispune [%]	20	100
Oblik ispune	Heksagon	Heksagon
Brzina tiskanja [mm/s]	30	10
Brzina gibanja mlaznice [mm/s]	50	50
Temperatura desnog ekstrudera [°C]	185	185
Temperatura lijevog ekstrudra [°C]	185	185
Temperatura podloge [°C]	50	50

3.2.4. Mikrokapsule

U farmaceutskoj industriji sve više se koriste postupci oblaganja djelatne tvari kako bi se omogućilo kontrolirano i produljeno oslobađanje lijeka te poboljšala terapijska učinkovitost. Jedna od metoda koje omogućuju isporuku djelatne tvari na ciljano mjesto kontroliranim oslobađanjem je *mikrokapsuliranje*, postupak kojim se vrlo sitne kapljice ili čestice tekućeg ili čvrstog materijala okružuju ili prevlače neprekidnim filmom polimernog materijala.³¹

Najčešće primjenjivana metoda je *sušenje raspršivanjem* jer je brza, ekonomična, ali i jednostavna, s obzirom da se odvija u jednom koraku. Pri mikrokapsuliranju djelatne tvari sušenjem raspršivanjem (Slika 18), potrebno je otopiti polimer i djelatnu tvar u etanolu ili acetonu. Takva otopina se pomoću pumpe dovodi do raspršivača smještenog na vrhu kolone za sušenje. Plin za sušenje se prije dovodenja u kolonu zagrijava i uvodi na vrhu kolone. Kapljice nastale atomiziranjem suše se u struji vrućeg plina, a kapljevina isparava i snižava temperaturu u koloni. Osušene čestice padaju na dno kolone, gdje ih povlači zrak u ciklon. U ciklonu se separiraju plin i čestice, pri čemu plin izlazi na vrhu ciklona, a čestice se prikupljaju u sabirnoj posudi na dnu.³¹



Slika 19. Skica aparature za sušenje raspršivanjem, pri čemu su A i B djelatna tvar odnosno polimer³²

3.2.4.1. Mikrokapsuliranje homopolimerom

Mikrokapsule su pripremljene u okviru diplomskog rada studenta Juraja Petanjeka.³²

Za oblaganje djelatne tvari homopolimerom korišteni su sljedeći materijali:

- Dronedaron-hidroklorid (DNR) kao djelatna tvar.
- Poli(vinil-alkohol) (PVA) proizvođača *Acros Organics*, prosječne molekulske mase 50000 do 85000 g/mol.

Za postupak sušenja raspršivanjem pripremljene su otopine koje sadrže DNR i PVA u omjeru 1:3, tako da su 3 g PVA otopljeni u 100 mL vode miješanjem na magnetnoj miješalici uz zagrijavanje, a 1 g DNR u 100 mL etanola, nakon čega su dvije otopine pomiješane te je dobiveno 200 mL otopine koja se koristila kao pojna smjesa za proces sušenja raspršivanjem.³²

Sušenje raspršivanjem provodilo se u laboratorijskom sušioniku s raspršivanjem Mini Spray Dryer B-290 (*Büchi Labortechnik AG, Switzerland*) (Slika 19), procesnih uvjeta prikazanih tablicom 6.



Slika 20. Sušionik s raspršivanjem *Mini Spray Dryer B-290*

Tablica 6. Procesni uvjeti sušenja raspršivanjem³²

Procesni parameter	Vrijednost
Protok zraka za raspršivanje	$(1,22-4,84) \times 10^{-4} \text{ m}^3/\text{s}$
Ulazna temperature	75 °C
Protok otopine	$2,5 \times 10^{-8} \text{ m}^3/\text{s}$
Protok zraka za sušenje	$1,06 \times 10^{-2} \text{ m}^3/\text{s}$
DNR:PVA	1:3

Tijekom provođenja eksperimenata mijenjan je protok zraka za raspršivanje, stoga su analizirana tri uzorka (Tablica 7). S obzirom da je sušionik s raspršivanjem baždaren, protoci zraka korišteni su kao postoci izračunati prema baždarnom dijagramu.

Tablica 7. Oznake uzoraka i pripadajući procesni uvjeti

Uzorak	Protok zraka / $\times 10^{-4} \text{ m}^3/\text{s}$
MK_PVA_40%	1,85
MK_PVA_50%	2,92
MK_PVA_60%	4,84

3.2.4.2. Mikrokapsuliranje kopolimerom

Pri razvoju dozirnih oblika ključno je razvijati materijale koji će djelatnu tvar pretvoriti u učinkovitu i korisnu tvar. Ispitan je kopolimer M85A15 izrađen za oblaganje i ispitivanje oslobađanja DNR, pri čemu je *M* metil-metakrilat (85 % mol.), a *A* 2-(Dimetilamino)etil-metakrilat (15 % mol.).

Kopolimeri za oblaganje mikrokapsula i mikrokapsule su izrađeni tijekom izvođenja kemijsko-inženjerskih vježbi u akademskoj godini 2018/2019. Kopolimere je izradila grupa studenata Josip Sacher i Matea Vučetić³⁷, a mikrokapsule su pripremile studentice Monika Leskovar i Antonija Matal.³³

Pojne smjese su pripremane kao otopine, tako da su 3 g metakrilatnog kopolimera otopljena u 50 mL acetona uz miješanje pomoću magnetne miješalice, a potom je otopina pomiješana sa 100 mL acetona u kojoj je otopljen 1 g DNR. Na kraju je otopina razrijeđena sa 150 mL vode. Procesni uvjeti sušenja raspršivanjem prikazani su tablicom 8, a oznake uzoraka i pripadajući procesni uvjeti tablicom 9.

Tablica 8. Procesni uvjeti sušenja raspršivanjem³³

Procesni parametar	Vrijednost
Protok zraka za raspršivanje	$(1,22-4,84) \times 10^{-4} \text{ m}^3/\text{s}$
Ulazna temperatura	65 °C
Protok otopine	$2,5 \times 10^{-8} \text{ m}^3/\text{s}$
Protok zraka za sušenje	$1,06 \times 10^{-2} \text{ m}^3/\text{s}$
DNR:PVA	1:3

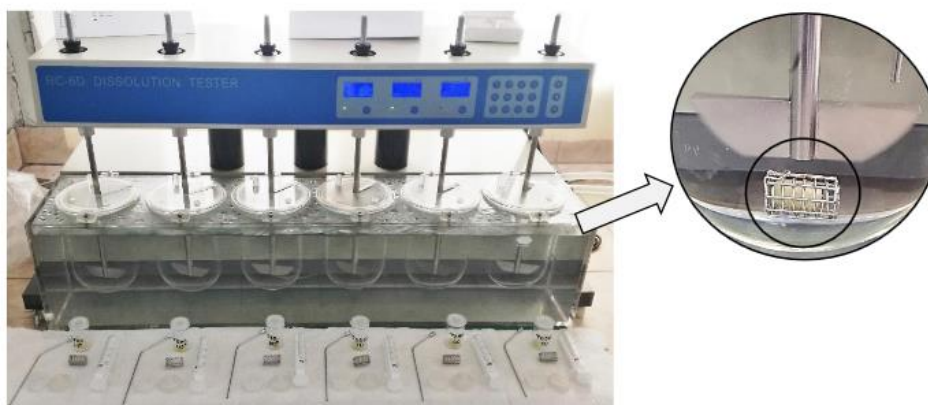
Tablica 9. Oznake uzoraka i pripadajući procesni uvjeti

Uzorak	Protok zraka / $\times 10^{-4} \text{ m}^3/\text{s}$
MK_M85A15_30%	1,22
MK_M85A15_40%	1,85
MK_M85A15_50%	2,92
MK_M85A15_60%	4,84

3.3. Ispitivanje oslobađanja metodama *in vitro*

3.3.1. Ispitivanje oslobađanja prema FDA metodi

Ispitivanja su provedena na uređaju za ispitivanje oslobađanja djelatnih tvari *RC-6D* (*Zhengzhou Nanbei, Kina*) s košaricom (Slika 20). Kao medij korišten je fosfatni pufer pH = 4,5 volumena 1000 mL, a za miješanje su korištene lopatice (USP II). Temperatura pufera podešena je na $37 \pm 0,5$ °C, a broj okretaja lopatica na 75 o/min.



Slika 21. Uređaj za *in vitro* ispitivanje oslobađanja djelatnih tvari
(*RC-6D Zhengzhou Nanbei Instrument*)

3.3.1.1. Pelete

Tvrde kapsule dimenzija 00 napunjene su s 430 mg peleta. Napunjene kapsule stavljene su u košarice za potapanje i dodane u medij. Uzorkovanje je provedeno u intervalima 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 i 120 minuta u skladu s FDA metodom za ispitivanje oslobađanja DNR iz tableta.²⁸

3.3.1.2. 3D tiskane tablete

Ispitivanje oslobađanja je provedeno tijekom 28 sati, s vremenom uzorkovanja od 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 600, 1320, 1440 i 1680 min.²⁹

3.3.1.3. 3D tiskane kapsule

Ispitivanje oslobađanja je provedeno tijekom 3 sata, s vremenom uzorkovanja od 10, 20, 30, 45, 60, 70, 80, 90, 105, 120, 135, 150, 165 i 180 min.

3.3.1.4. Mikrokapsule

Kako bi se *in vitro* metodom ispitala brzina oslobađanja djelatne tvari, mikrokapsule dobivene sušenjem raspršivanjem punjene su u želatinozne kapsule. Kapsule su punjene mikrokapsulama obloženima homopolimerom tako da je svaka kapsula sadržavala približno jednaku količinu DNR-a (42,75 mg). Količina mikrokapsula koja je stavljena u kapsule je 171 mg, a za svaki uzorak pripremane su tri kapsule.³² Za ispitivanje oslobađanja iz mikrokapsula obloženih kopolimerom, u svaku je kapsulu stavljeno 200 mg dobivenog produkta, a kako bi se dobila ponovljivost eksperimentalnih rezultata, za svaki uzorak napunjene su po dvije kapsule.³³

Ispitivanje oslobađanja je provedeno tijekom 24 sata, s vremenom uzorkovanja od 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 1200, 1440 min.³²

3.3.2. UV/Vis spektrofotometrija

UV/Vis spektrofotometrija korištena je za određivanje koncentracije dronedaron-hidroklorida u vremenu. UV/Vis spektrofotometar *UV-1280* (*Shimadzu, Japan*) prikazan je na slici 22, a radno područje korištenog spektrofotometra je od 190 do 1100 nm.



Slika 22. UV/Vis spektrofotometar (*UV-1280, Shimadzu*)

Mjerenja su provedena pri valnoj duljini od 289,5 nm što odgovara maksimumu apsorpcije DNR u metanolu i u fosfatnom puferu (pH = 4,5). Prije ispitivanja, a prilikom uzorkovanja

uzorci su filtrirani kroz filter *CHROMAFIL® Xtra H-PTFE-45/25*. Koncentracije su izračunate na temelju izmjerenih apsorbancija i pripremljenih umjernih pravaca.

3.4. Obrada podataka

Nakon provedenih *in vitro* testiranja dobiveni podaci su obrađeni softverom *GastroPlus™* tvrtke *SimulationsPlus, Inc.* Korištenjem literaturnih podataka o farmakokinetici DNR izrađen je profil *in vivo* oslobađanja, odnosno ovisnost koncentracije u plazmi o vremenu za svaki dozirni oblik. Pomoću softverskog modula *IVIVCPlus™* izrađene su *in vitro-in vivo* korelacije i uspoređeni podaci.

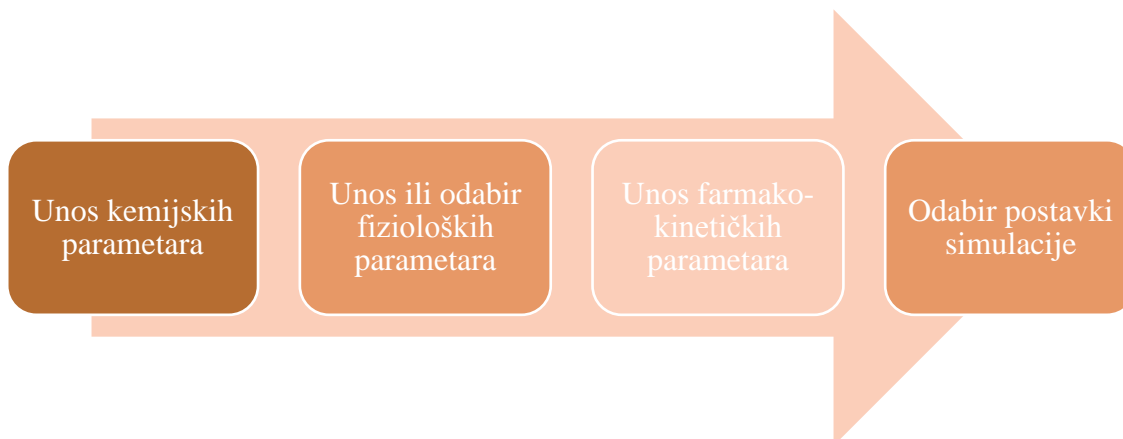
3.4.1. *GastroPlus™*

GastroPlus™ je napredni kompjutorski program koji simulira intravensku, gastrointestinalnu, okularnu, nazalnu i plućnu apsorpciju, farmakokinetiku i farmakodinamičke učinke za lijekove dozirane u ljudima i životinjama. Farmakokinetički model s jednim, dva ili tri odjeljka omogućava predviđanje profila koncentracije u plazmi s odgovarajućim ulaznim podacima, uzimajući u obzir interakcije između apsorpcije i farmakokinetike primijećene s mnogim lijekovima. Fiziološki zasnovan model farmakokinetike (PBPK) u modulu *PBPKPlus™* omogućava predviđanje distribucije lijekova u različitim tkivima, a može se postaviti i predvidjeti i više farmakodinamičkih efekata.

Simulacije u *GastroPlus™* programu sastoje se od numeričke integracije diferencijalnih jednadžbi koje koordiniraju skup dobro karakteriziranih fizičkih fenomena koji se javljaju i djeluju kao rezultat transporta lijeka, otapanja/taloženja, apsorpcije/desorpcije, izlučivanja, metabolizma crijeva, distribucije, enterohepatičke cirkulacije i ostalih mehanizama čišćenja. Apsorpcijski model koji se koristi u simulacijama je napredni model apsorpcije i prijenosa (eng. *Advanced Compartmental Absorption and Transit – ACAT*) koji se temelji na originalnom CAT modelu kojeg su 1999. godine objavili Yu i Amidon. Model opisuje gastrointestinalni trakt kao skup odjeljaka koji približno odgovaraju segmentima probavnog trakta. Lijek u obliku otopine ili suspenzije prelazi iz jednog u drugi odjeljak i može se apsorbirati u bilo kojem od njih.³⁸

3.4.2. Simulacije

Provođenje simulacije u *GastroPlus*TM sastoji se od više koraka, shematski prikazano slikom 23.



Slika 23. Tijek simulacije u *GastroPlus*TM

Kemijski parametri za svaki zapis mogu se unijeti ručno iz postojećih analiza ili koristeći *ADMET Predictor*TM modul koji omogućava dobivanje podataka pomoću *in silico* analize strukture (Slika 24). S obzirom da svi zapisi sadrže istu djelatnu tvar, u program je unesena kemijska struktura dronedaron-hidroklorida (DNR), iz čega su dobivene vrijednosti kemijskih parametara potrebnih za simulaciju. Ručno su uneseni podaci o dozi lijeka (Tablica 10), vrsti dozirnog oblika te *in vitro* podaci o oslobađanju za svaki dozirni oblik.

Compound: Dronedaron HCl
Molecular Formula: C₃₁H₄₄N₂O₅
Molecular Weight (g/mol): 556.77
logP (neutral): 6.06 @pH: .1

Pharmacokinetics: SI Trans. Time (h) = 12.9, Mean Abs. Time (h) = 7.22, Longest Diss. Time (h) @ pH 6.8 = 0.984 hours, Max Abs. Dose (S+) = 4.06E+2 mg, Max Abs. Dose (R) = 2.805E+2 mg

Effective Permeability: P_{eff} (cm/s x 10⁻⁴): 0.23, S_{eff} P_{eff} x 10⁻⁴ (Human): 0.23

Doseal No. = 78,3821 (Red)
Absorption No. = 1,731 (Green)
Dissolution No. = 12,7 (Green)

Slika 24. Sučelje odjeljka za definiranje spoja

Tablica 10. Masa DNR u dozirnom obliku

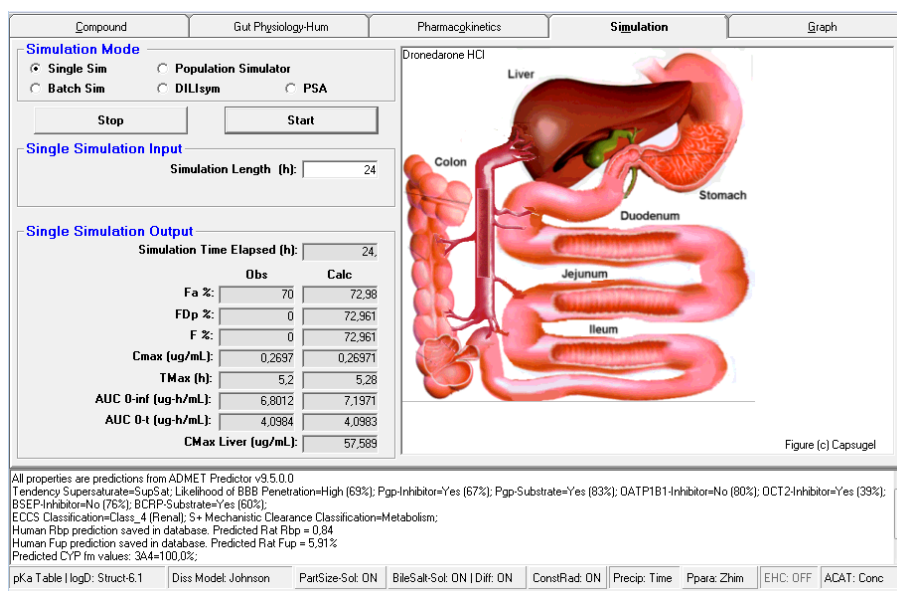
Dozirni oblik	Oznaka	Doza DNR [mg]
Komercijalna tableta	<i>Multaq</i> [®]	400
Pelete	Pelete_Imp_Obl_10%	30,60
	Pelete_100mg_Obl_10%	35,36
	Pelete_400mg_Obl_10%	257,71
3D tiskane tablete	3D_Tablete_PEG25%	60,48
	3D_Tablete_PEG50%	75,24
	3D_Tablete_PEG75%	81,90
	3D_Tablete_PEG100%	97,86
3D tiskane kapsule	3D_Kapsule_0,25mm	194,64
	3D_Kapsule_0,50mm	194,40
	3D_Kapsule_0,75mm	197,74
	3D_Kapsule_1mm	196,55
Mikrokapsule	MK_PVA_3-1_40%	47,98
	MK_PVA_3-1_50%	37,62
	MK_PVA_3-1_60%	35,95
	MK_M85A15_30%	50,12
	MK_M85A15_40%	51,90
	MK_M85A15_50%	55,36
	MK_M85A15_60%	56,79

Odabran je fiziološki model *ljudski-siti*, s obzirom da je farmakokinetika DNR ispitivana u takvim uvjetima, a ASF model Opt logD Model SA/V 6.1, već primjećen u literaturi. Farmakokinetički parametri preuzeti su iz literature (Tablica 11), a za procjenu farmakokinetike korišteno je PBPK modeliranje.

Tablica 11. Farmakokinetički parametri dronedaron-hidroklorida³⁴

Parametar	Vrijednost i mjerna jedinica
Postotak apsorpcije	70 – 94 %
t_{\max}	3 – 6 h
C_{\max}	0,084 – 0,167 $\mu\text{g/mL}$
AUC	0,65 – 1,03 $\mu\text{g h/mL}$
<i>Hepatic Clearance</i>	130 – 150 L/h

Simulacija je provedena za period od 24 sata (Slika 25), a dobiveni podaci korišteni su za izradu *in vitro-in vivo* korelacija.



Slika 25. Provođenje simulacije

3.4.3. Korelacije i konvolucija

*IVIVCPlus*TM modul za izradu korelacija uključuje numeričku dekonvoluciju, tradicionalne Wagner-Nelson i Loo-Riegelman dekonvolucije, kao i najsuvremeniju mehaničku dekonvoluciju i korelaciju u jednom koraku. Mehanička dekonvolucija prihvaća bilo koju kombinaciju nelinearnosti i složenosti u ponašanju lijeka. Numerička dekonvolucija i tradicionalne metode jednostavne su za korištenje, ali su i ograničene pojednostavljajućim pretpostavkama koje su neophodne za korištenje ovakvog pristupa.

Način provođenja *in vitro-in vivo* korelacija (IVIVK) može se odabrati s obzirom na svojstva dozirnog oblika. Za sve dozirne oblike proveden je jednak proces koreliranja, postavki prikazanih tablicom 12.

Tablica 12. Postavke IVIVK

Metoda dekonvolucije	Mehanistički apsorpcijski model
IVIVK procedura	Korelacija nakon dekonvolucije
Weibullova funkcija	Jednostruka
Početna procjena parametara	Ručno (iz <i>in vitro</i> podataka)

Korelacija se izrađuje na više razina; linearnom, potencijском i polinomnom funkcijom, a program odabire onu koja najbolje opisuje set podataka. Osim ovisnosti *in vitro* i *in vivo* podataka, izrađuje se i profil koncentracije u plazmi u ovisnosti o vremenu za korelirane podatke te se uspoređuje s unešenim (simuliranim) podacima.

Nakon korelacije slijedi konvolucija podataka. Konvolucija je prema definiciji matematička funkcija nastala integriranjem umnoška dviju funkcija po intervalu njihove definicije gdje su te funkcije ravnopravne, tako da svaka infinitezimalna promjena jedne funkcije utječe na drugu funkciju u cijelom intervalu definicije.³⁵ Kao rezultat konvolucije dobiva se set podataka koji prikazuje predviđenu koncentraciju u plazmi u ovisnosti o vremenu, dobivenu iz apsolutne bioraspoloživosti i prethodno izrađene *in vitro-in vivo* korelacije. Ti podaci se statističkim parametrima uspoređuju s onima dobivenim simulacijom, kao i farmakokinetički parametri c_{\max} i AUC.

4. REZULTATI

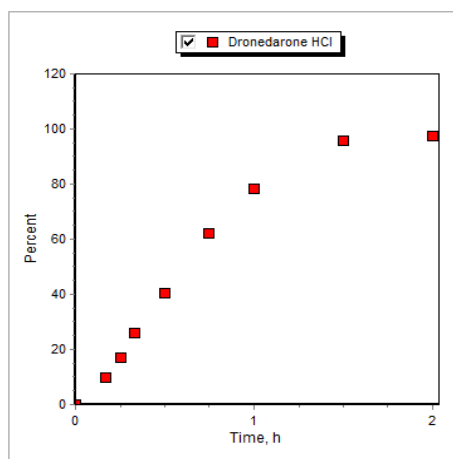
Rezultati za pripravljene farmaceutske alternative prikazani su sukladno tijeku eksperimentalnog dijela; od *in vitro* oslobađanja za skupinu dozirnih oblika, preko *in vitro-in vivo* korelacija do usporedbe ovisnosti koncentracije u plazmi o vremenu za podatke dobivene simulacijom i predviđene podatke dobivene konvolucijom, uz kvantitativnu usporedbu farmakokinetičkih parametara c_{\max} i AUC.

Točnost korelacija i usporedba podataka opisane su pomoću četiri parametra:

- R^2 , koeficijent determinacije (0 – 1), ukazuje koliko se eksperimentalni i korelirani podaci slažu međusobno i s očekivanim podacima i vrijednostima,
- SEP (eng. *Standard Error of Prediction* – standardna pogreška predviđanja),
- MAE (eng. *Mean Absolute Error* – srednja apsolutna pogreška) te
- AIC (eng. *Akaike Information Criterion*) kao kriterij koji, nakon što se *in vitro* i *in vivo* podaci opišu pomoću svih modela, odlučuje koji model najbolje opisuje podatke temeljem najniže vrijednosti.

4.1. Komercijalna tableta

Grafički prikaz ovisnosti udjela oslobođene tvari u vremenu za *in vitro* ispitivanje oslobađanja iz komercijalne tablete *Multaq*® nalazi se na slici 26.

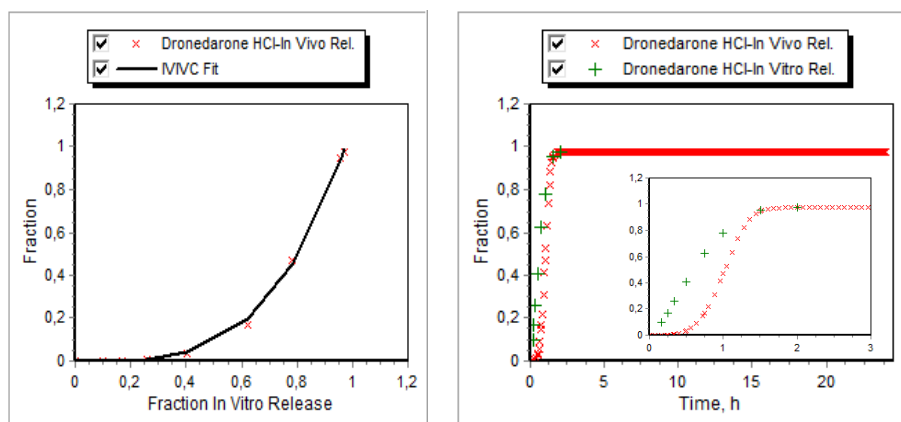


Slika 26. *In vitro* ispitivanje oslobađanja za komercijalnu tabletu

Korelacija je potencijnska funkcija prikazana jednadžbom 8:

$$y = 1,096 \cdot x^{3,643} \quad (8)$$

pri čemu je x udio *in vitro*, a y udio *in vivo* oslobođene djelatne tvari, grafički prikazano slikom 27, kao i ovisnost udjela oslobođenog o vremenu. Parametri korelacije prikazani su tablicom 13.

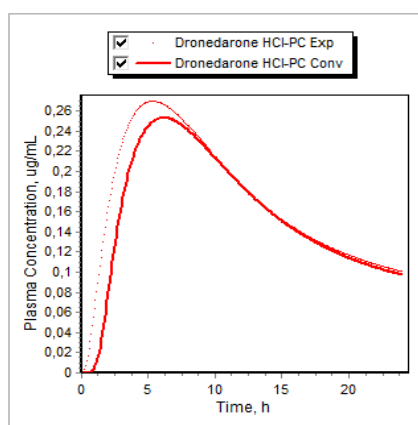


Slika 27. Grafički prikaz *in vitro-in vivo* korelacije za komercijalnu tabletu

Tablica 13. Parametri korelacije *in vitro* i *in vivo* podataka

Dozirni oblik	R ²	SEP	MAE	AIC
<i>Multaq</i> ®	0,999	0,013	$9,62 \times 10^{-3}$	-53,94

Profil koncentracije u plazmi u ovisnosti o vremenu dobiven konvolucijom IVIVK i apsolutne bioraspodjelivosti u usporedbi sa simuliranim podacima prikazan je slikom 28, a parametri tablicom 14.



Slika 28. Ovisnost koncentracije DNR u plazmi o vremenu

Tablica 14. Parametri usporedbe simuliranih podataka i konvolucijskog profila

Dozirni oblik	R ²	SEP	MAE	AIC
<i>Multaq</i> ®	0,865	0,027	0,014	-463,4

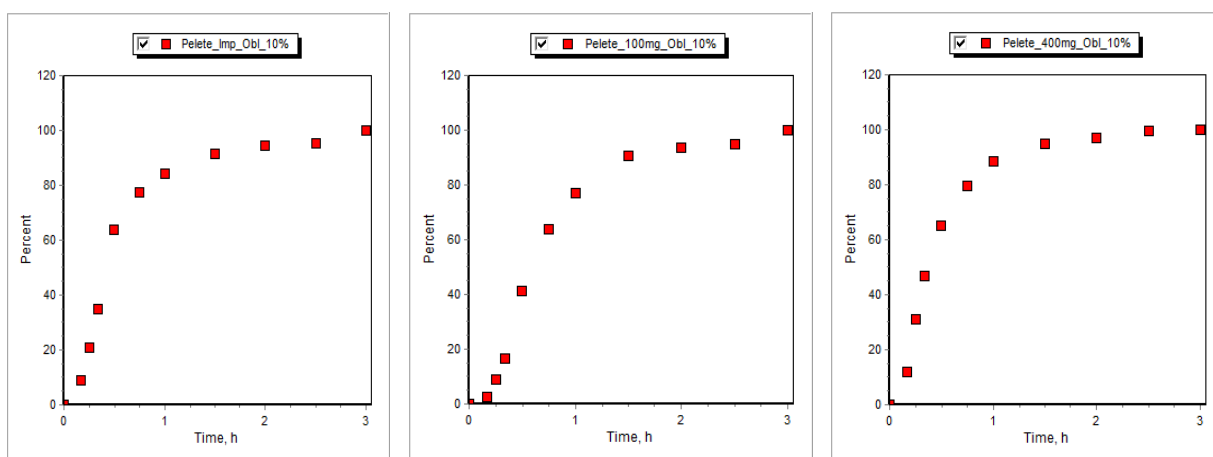
Kvantitativna usporedba farmakokinetičkih parametara dobivenih iz simulacije i podataka predviđenih konvolucijom prikazana je tablicom 15.

Tablica 15. Usporedba simuliranih (očekivanih) i konvolucijom predviđenih podataka

Dozirni oblik	<i>c</i> _{max} [µg/L]			AUC [µg/(mL h)]		
	Očekivana	Predviđena	Postotak pogreške	Očekivana	Predviđena	Postotak pogreške
<i>Multaq</i> ®	0,270	0,253	6,117	4,098	3,771	7,983

4.2. Pelete

Grafički prikaz ovisnosti udjela oslobođene tvari u vremenu za *in vitro* ispitivanje oslobađanja iz peleta kao dozirnih oblika nalazi se na slici 29.



Slika 29. *In vitro* ispitivanje oslobađanja za pelete

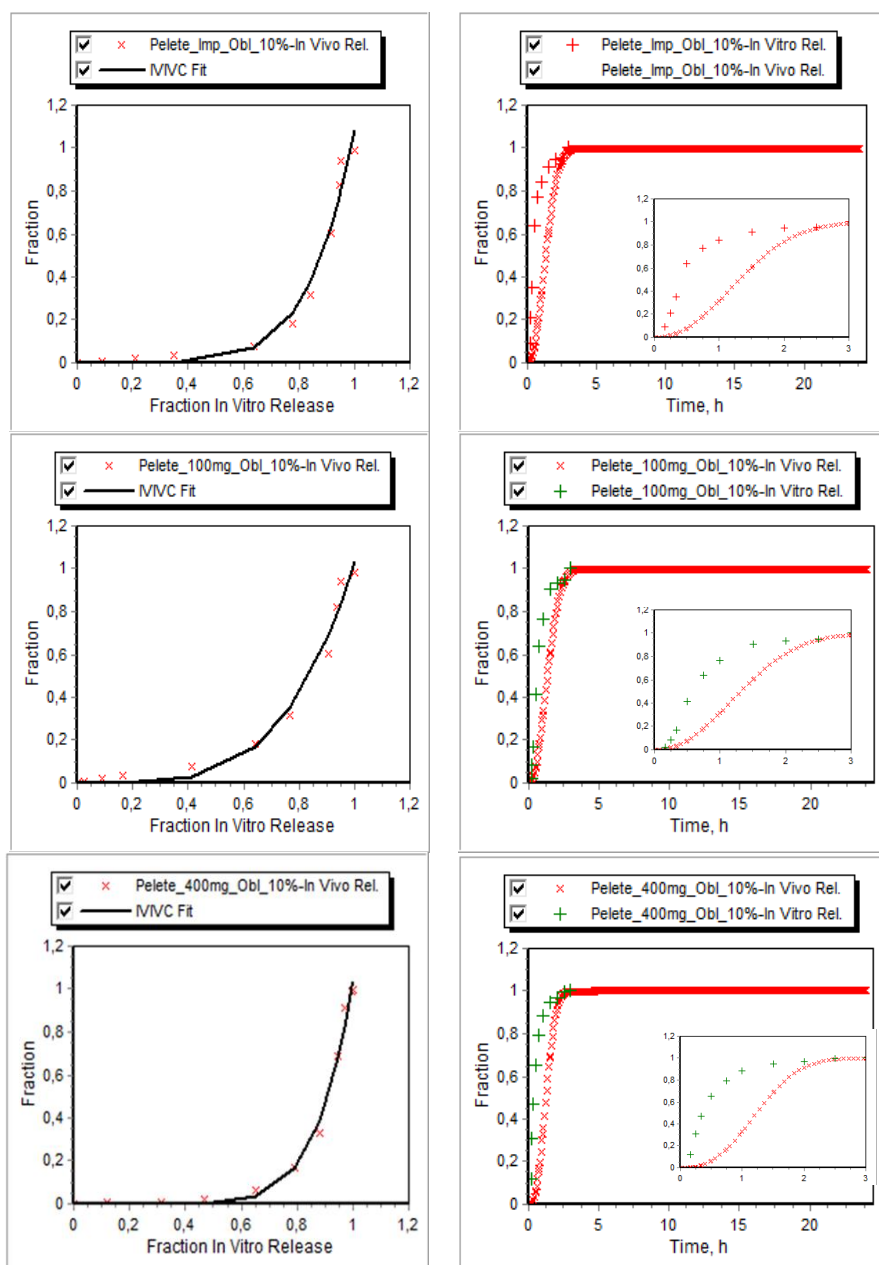
Jednadžbama 9, 10 i 11 prikazane su korelacije za impregnirane, 100 mg i 400 mg obložene pelete:

$$y = 1,083 \cdot x^{6,069} \quad (9)$$

$$y = 1,032 \cdot x^{4,103} \quad (10)$$

$$y = 1,031 \cdot x^{7,871} \quad (11)$$

pri čemu je x udio *in vitro*, a y udio *in vivo* oslobođene djelatne tvari, grafički prikazano slikom 30, kao i ovisnost udjela oslobođenog o vremenu. Parametri korelacije prikazani su tablicom 16.

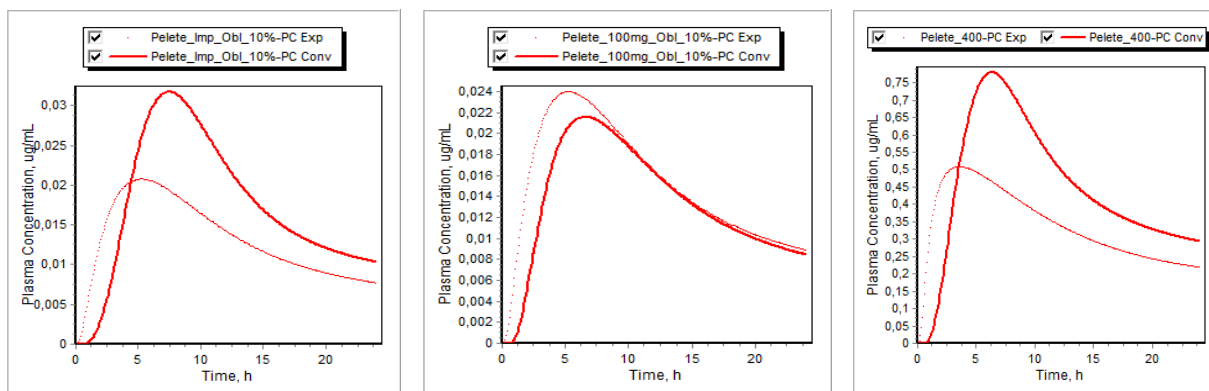


Slika 30. Grafički prikazi *in vitro-in vivo* korelacija za pelete

Tablica 16. Parametri korelacija *in vitro* i *in vivo* podataka

Dozirni oblik	R ²	SEP	MAE	AIC
Pelete_Imp_Obl_10%	0,977	0,059	0,044	-31,93
Pelete_100mg_Obl_10%	0,984	0,050	0,040	-35,57
Pelete_400mg_Obl_10%	0,992	0,037	0,025	-42,36

Profil koncentracije u plazmi u ovisnosti o vremenu dobiven konvolucijom IVIVK i apsolutne bioraspodivnosti u usporedbi sa simuliranim podacima prikazan je slikom 31, a parametri usporedbe tablicom 17.



Slika 31. Ovisnost koncentracije DNR u plazmi o vremenu za tri vrste peleta

Tablica 17. Parametri usporedbe simuliranih podataka i konvolucijskog profila

Dozirni oblik	R ²	SEP	MAE	AIC
Pelete_Imp_Obl_10%	0,646	$7,26 \times 10^{-3}$	$6,34 \times 10^{-3}$	-1245,0
Pelete_100mg_Obl_10%	0,764	$3,34 \times 10^{-3}$	$1,81 \times 10^{-3}$	-1713,1
Pelete_400mg_Obl_10%	0,598	0,186	0,163	706,3

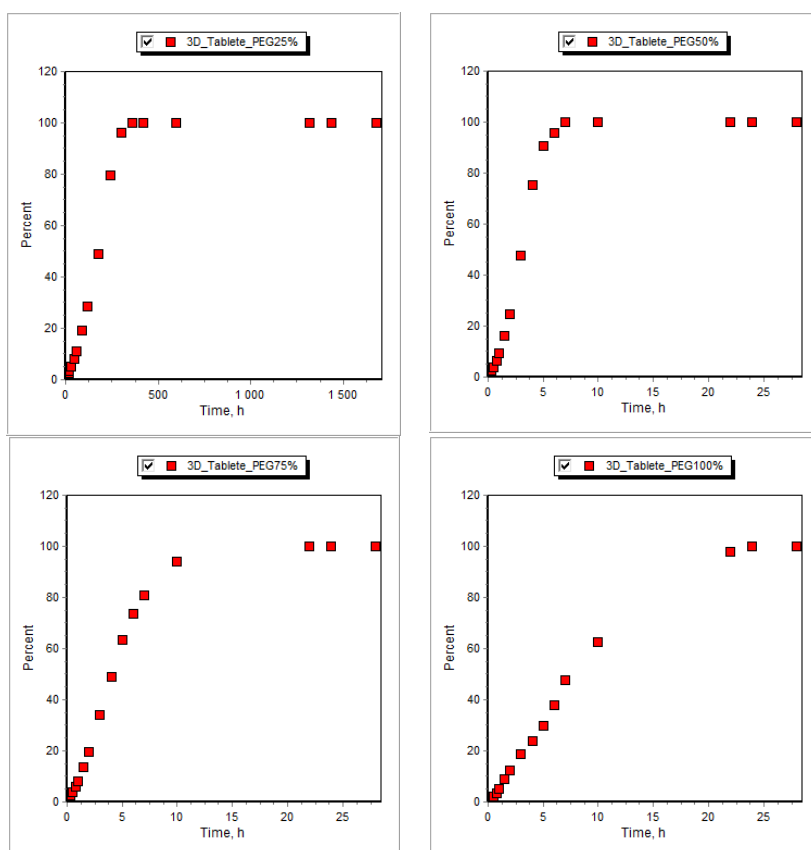
Kvantitativna usporedba farmakokinetičkih parametara dobivenih iz simulacije i podataka predviđenih konvolucijom prikazana je tablicom 18.

Tablica 18. Usporedba simuliranih (očekivanih) i konvolucijom predviđenih podataka

Dozirni oblik	c_{\max} [$\mu\text{g/L}$]			AUC [$\mu\text{g}/(\text{mL h})$]		
	Očekivana	Predviđena	Postotak pogreške	Očekivana	Predviđena	Postotak pogreške
Pelete_Imp Obl_10%	0,021	0,032	52,64	0,316	0,414	31,13
Pelete_100mg Obl_10%	0,024	0,022	10,07	0,365	0,321	11,92
Pelete_400mg Obl_10%	0,508	0,780	53,37	8,143	10,66	30,87

4.3. 3D tiskane tablete

Grafički prikaz ovisnosti udjela oslobođene tvari u vremenu za *in vitro* ispitivanje oslobađanja iz 3D tiskanih tableta kao dozirnih oblika nalazi se na slici 32.



Slika 32. *In vitro* ispitivanje oslobađanja za 3D tiskane tablete

Jednadžbama 12, 13, 14 i 15 prikazane su korelacije za 3D tiskane tablete s 25, 50, 75 i 100 %-tnom ispunom:

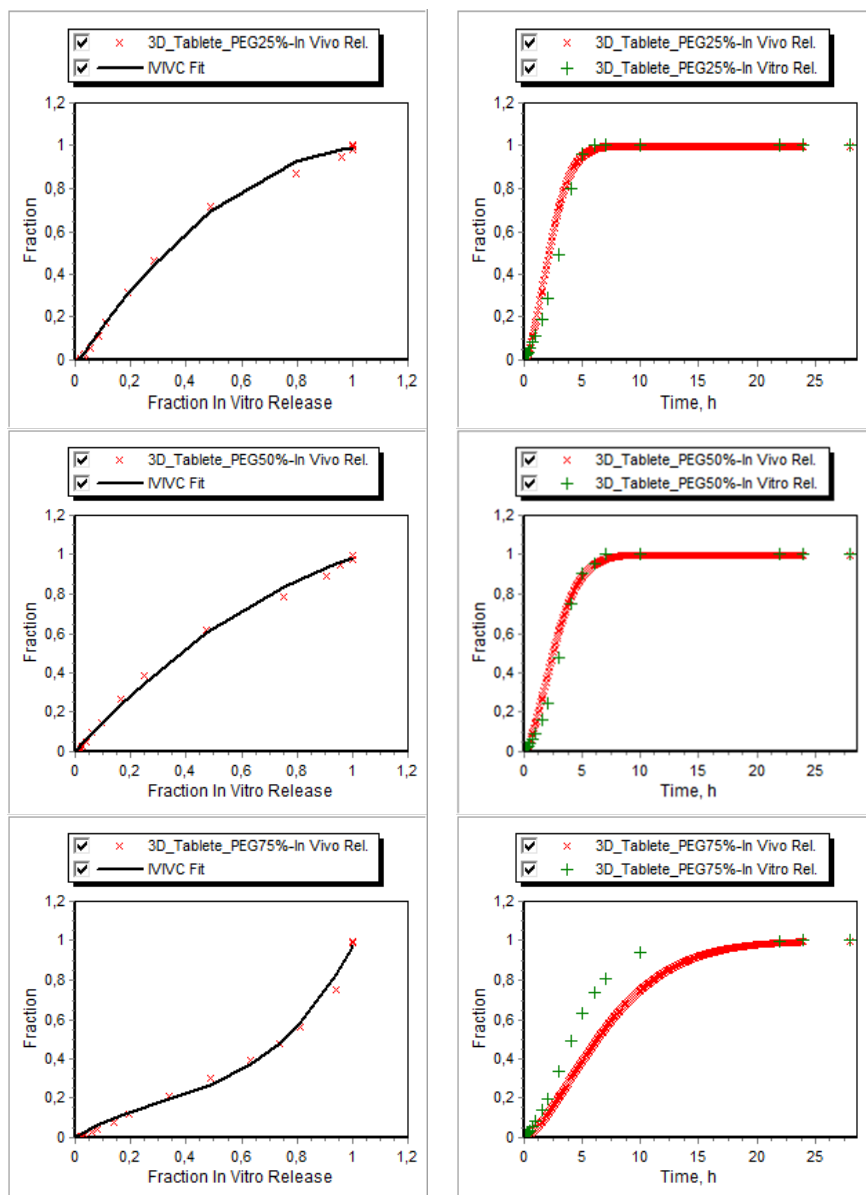
$$y = -0,024 + 1,892 \cdot x + (-0,881) \cdot x^2 \quad (12)$$

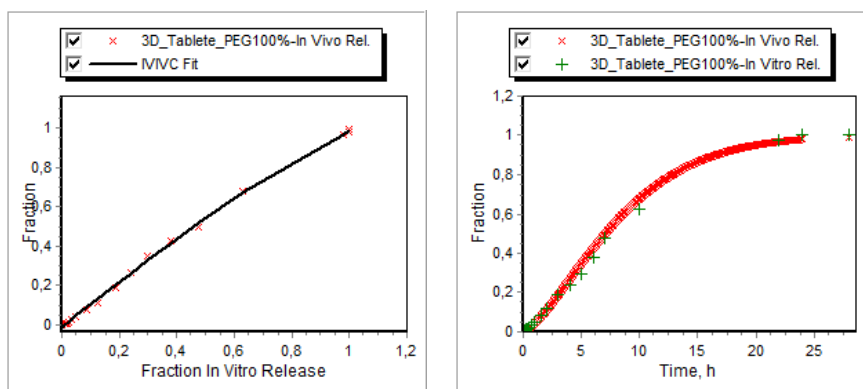
$$y = 2,34 \times 10^{-3} + 1,518 \cdot x + (-0,540) \cdot x^2 \quad (13)$$

$$y = 7,09 \times 10^{-5} + 0,881 \cdot x + (-1,432) \cdot x^2 + 1,542 \cdot x^3 \quad (14)$$

$$y = -0,012 + 1,153 \cdot x + (-6,23 \times 10^{-3}) \cdot x^2 + (-0,149) \cdot x^3 \quad (15)$$

pri čemu je x udio *in vitro*, a y udio *in vivo* oslobođene djelatne tvari, grafički prikazano slikom 33, kao i ovisnost udjela oslobođenog o vremenu. Parametri korelacija prikazani su tablicom 19.



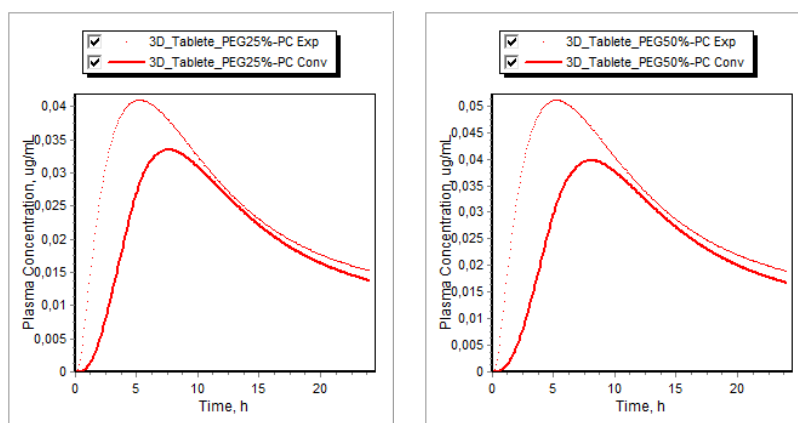


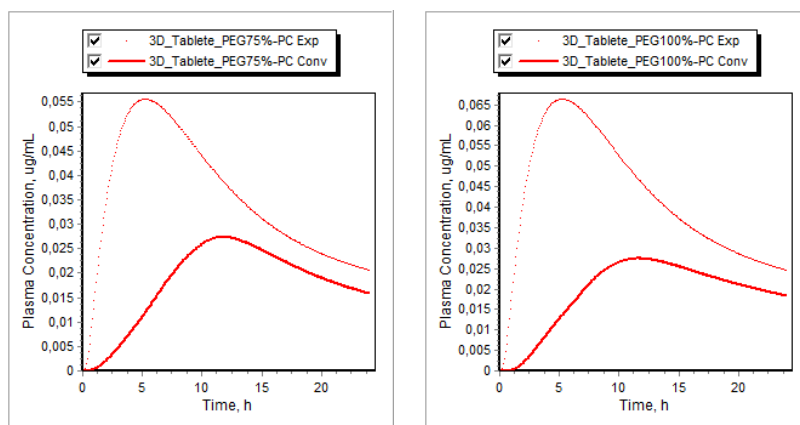
Slika 33. Grafički prikazi *in vitro-in vivo* korelacija za 3D tiskane tablete

Tablica 19. Parametri korelacija *in vitro* i *in vivo* podataka

Dozirni oblik	R ²	SEP	MAE	AIC
3D_Tablete_25%	0,998	0,020	0,016	-83,40
3D_Tablete_50%	0,996	0,025	0,020	-74,62
3D_Tablete_75%	0,995	0,025	0,019	-72,72
3D_Tablete_100%	0,999	0,011	$8,56 \times 10^{-3}$	-102,9

Profil koncentracije u plazmi u ovisnosti o vremenu dobiven konvolucijom IVIVK i apsolutne bioraspodivnosti u usporedbi sa simuliranim podacima prikazan je slikom 34, a parametri usporedbe tablicom 20.





Slika 34. Ovisnost koncentracije u plazmi o vremenu za četiri vrste 3D tiskanih tableta

Tablica 20. Parametri usporedbe simuliranih podataka i konvolucijskog profila

Dozirni oblik	R ²	SEP	MAE	AIC
3D_Tablete_25%	0,590	$8,75 \times 10^{-3}$	$5,27 \times 10^{-3}$	-1133,2
3D_Tablete_50%	0,543	0,012	$7,66 \times 10^{-3}$	-929,4
3D_Tablete_75%	0,415	0,023	0,017	-558,4
3D_Tablete_100%	0,422	0,029	0,023	-419,4

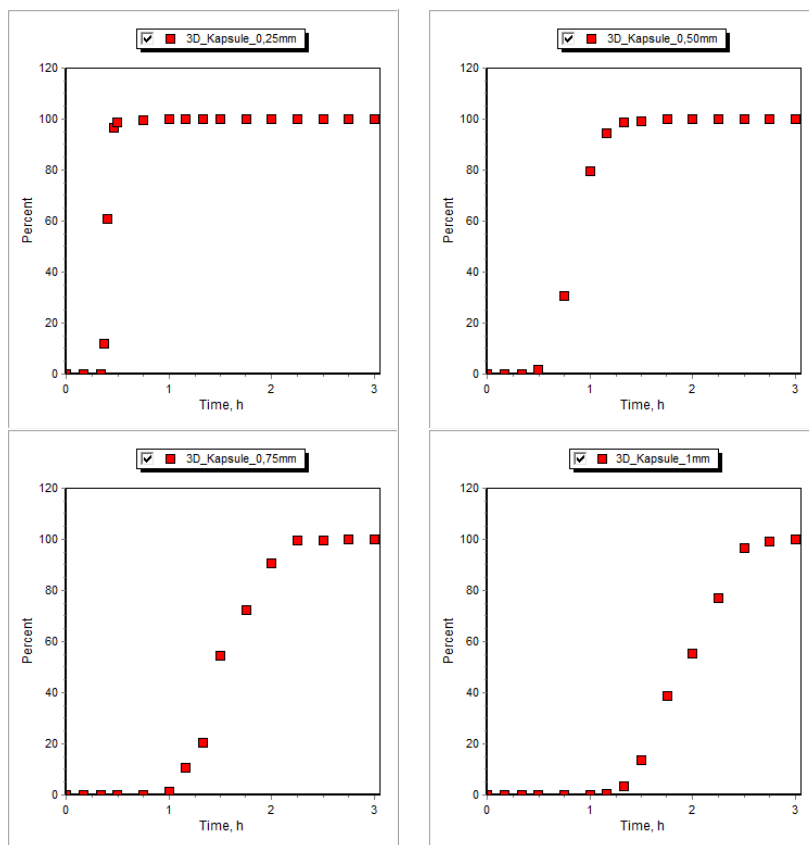
Kvantitativna usporedba farmakokinetičkih parametara dobivenih iz simulacije i podataka predviđenih konvolucijom prikazana je tablicom 21.

Tablica 21. Usporedba simuliranih (očekivanih) i konvolucijom predviđenih podataka

Dozirni oblik	c_{\max} [$\mu\text{g/L}$]			AUC [$\mu\text{g}/(\text{mL h})$]		
	Očekivana	Predviđena	Postotak pogreške	Očekivana	Predviđena	Postotak pogreške
3D_Tablete_25%	0,041	0,033	18,34	0,623	0,497	20,15
3D_Tablete_50%	0,051	0,040	22,22	0,775	0,592	23,61
3D_Tablete_75%	0,056	0,027	50,77	0,843	0,428	49,23
3D_Tablete_100%	0,066	0,027	58,68	1,008	0,456	54,76

4.4. 3D tiskane kapsule

Grafički prikaz ovisnosti udjela oslobođene tvari u vremenu za *in vitro* ispitivanje oslobađanja iz 3D tiskanih kapsula kao dozirnih oblika nalazi se na slici 35.



Slika 35. *In vitro* ispitivanje oslobađanja za 3D tiskane kapsule

Jednadžbama 16, 17, 18 i 19 prikazane su korelacije za 3D tiskane kapsule s debljinom stijenke od 0,25, 0,50, 0,75 i 1 mm:

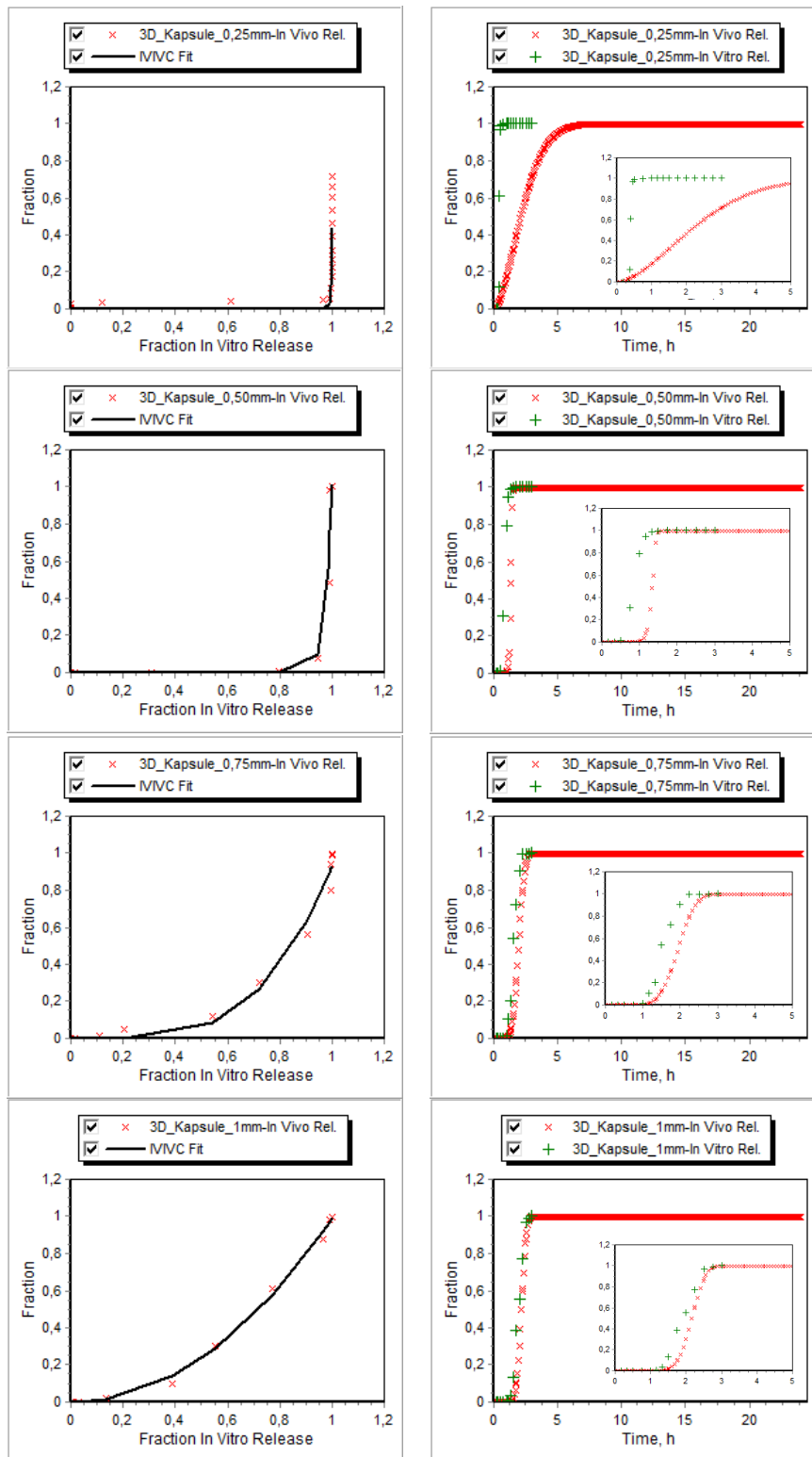
$$y = 0,436 \cdot x^{264,1} \quad (16)$$

$$y = 1,013 \cdot x^{42,14} \quad (17)$$

$$y = 0,930 \cdot x^{3,882} \quad (18)$$

$$y = 0,986 \cdot x^{2,050} \quad (19)$$

pri čemu je x udio *in vitro*, a y udio *in vivo* oslobođene djelatne tvari, grafički prikazano slikom 36, kao i ovisnost udjela oslobođenog o vremenu. Parametri korelacija prikazani su tablicom 22.

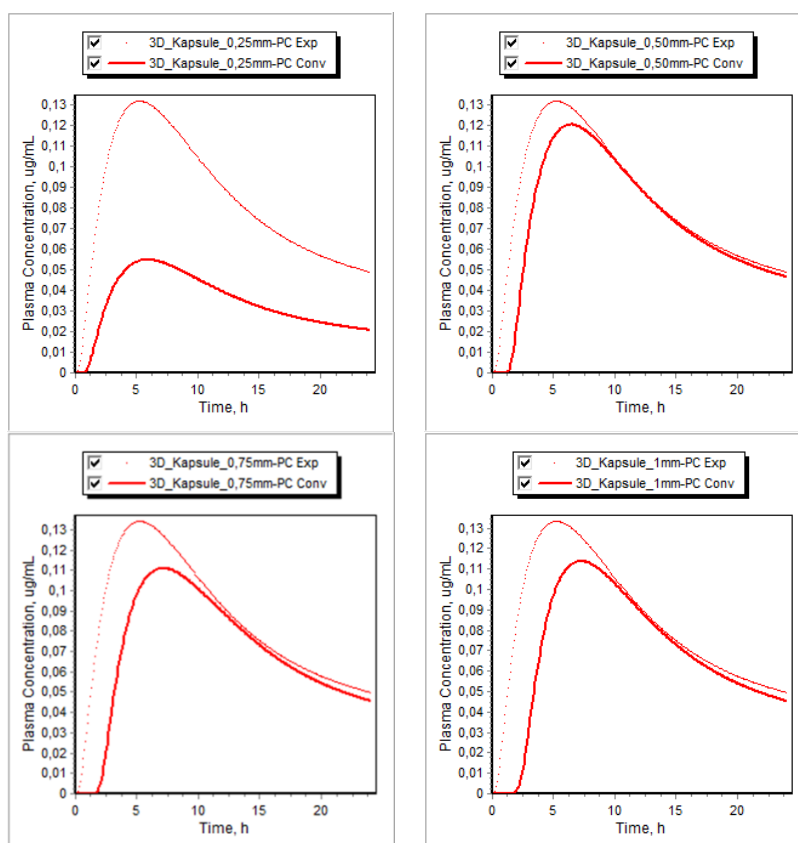


Slika 36. Grafički prikaz *in vitro-in vivo* korelacija za 3D tiskane kapsule

Tablica 22. Parametri korelacija *in vitro* i *in vivo* podataka

Dozirni oblik	R ²	SEP	MAE	AIC
3D_Kapsule_0,25mm	0,703	0,136	0,101	-15,82
3D_Kapsule_0,50mm	0,980	0,068	0,031	-36,20
3D_Kapsule_0,75mm	0,986	0,047	0,032	-46,83
3D_Kapsule_1mm	0,998	0,019	0,011	-74,56

Profil koncentracije u plazmi u ovisnosti o vremenu dobiven konvolucijom IVIVK i apsolutne biorasploživosti u usporedbi sa simuliranim podacima prikazan je slikom 37, a parametri usporedbe tablicom 23.



Slika 37. Ovisnost koncentracije u plazmi o vremenu za četiri vrste 3D tiskanih kapsula

Tablica 23. Parametri usporedbe simuliranih podataka i konvolucijskog profila

Dozirni oblik	R ²	SEP	MAE	AIC
3D_Kapsule_0,25mm	0,487	0,053	0,049	-53,34
3D_Kapsule_0,50mm	0,770	0,018	9,44×10 ⁻³	-688,10
3D_Kapsule_0,75mm	0,622	0,027	0,016	-444,6
3D_Kapsule_1mm	0,611	0,029	0,016	-412,1

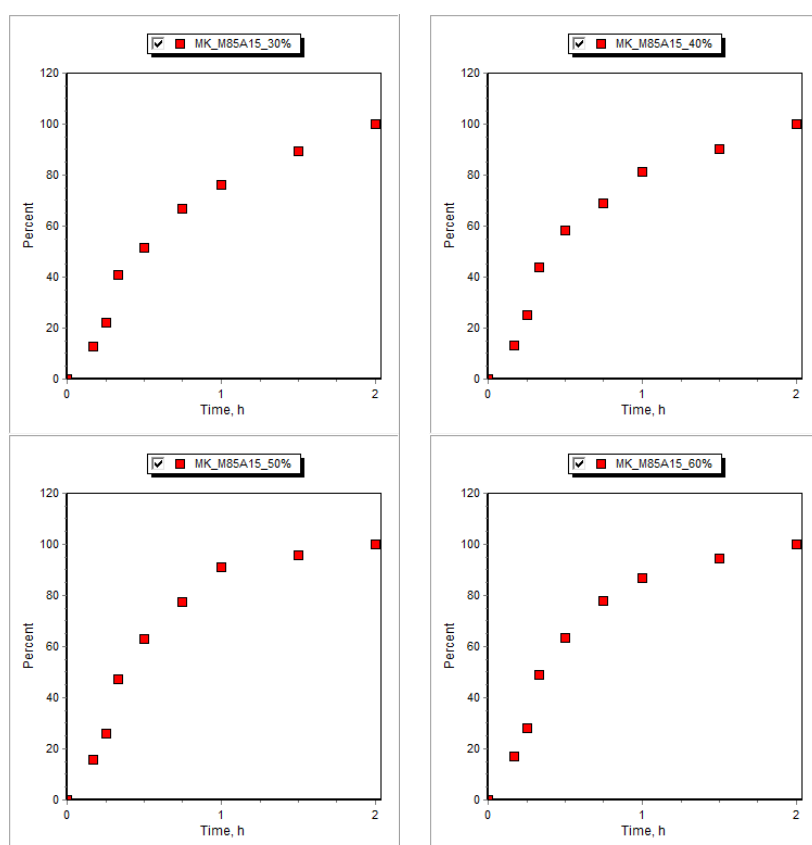
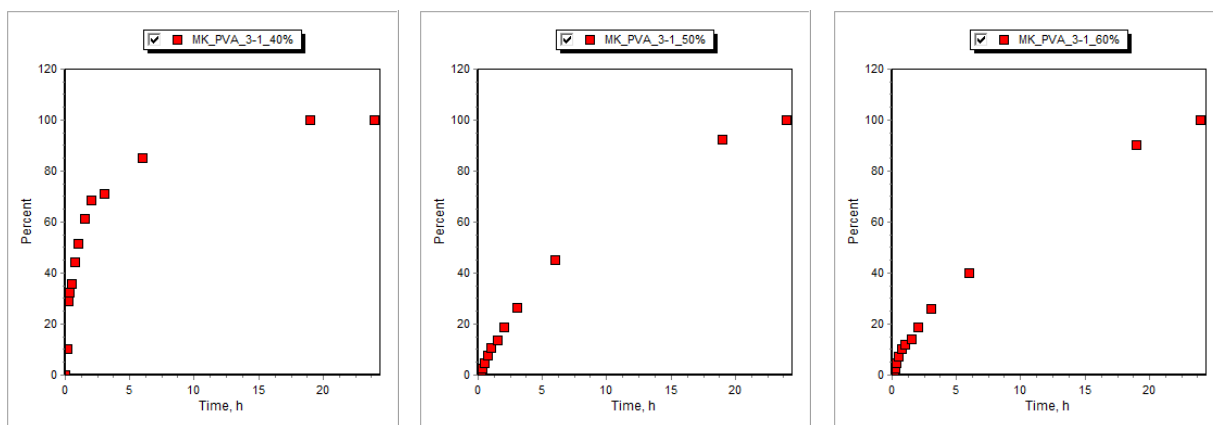
Kvantitativna usporedba farmakokinetičkih parametara dobivenih iz simulacije i podataka predviđenih konvolucijom prikazana je tablicom 24.

Tablica 24. Usporedba simuliranih (očekivanih) i konvolucijom predviđenih podataka

Dozirni oblik	c _{max} [µg/L]			AUC [µg/(mL h)]		
	Očekivana	Predviđena	Postotak pogreške	Očekivana	Predviđena	Postotak pogreške
3D_Kapsule_0,25mm	0,132	0,055	58,38	2,007	0,882	59,05
3D_Kapsule_0,50mm	0,132	0,120	8,67	2,005	1,778	11,33
3D_Kapsule_0,75mm	0,134	0,111	17,23	2,039	1,655	18,83
3D_Kapsule_1mm	0,133	0,114	14,64	2,027	1,646	18,79

4.5. Mikrokapsule

Grafički prikaz ovisnosti udjela oslobođene tvari u vremenu za *in vitro* ispitivanje oslobađanja iz mikrokapsula kao dozirnih oblika nalazi se na slici 38.



Slika 38. *In vitro* ispitivanje oslobađanja za mikrokapsule

Jednadžbama 20, 21 i 22 prikazane su korelacije za mikrokapsule obložene polivinilnim alkoholom procesom sušenja raspršivanjem s različitim protocima zraka za raspršivanje od 40, 50 i 60 %, dok jednadžbe 23, 24, 25 i 26 prikazuju korelacije za mikrokapsule oblagane metakrilatnim kopolimerom M85A15 protokom zraka za raspršivanje od 30, 40, 50 i 60 %:

$$y = 1,002 \cdot x^{2,538} \quad (20)$$

$$y = (-4,95 \times 10^{-4}) + 0,330 \cdot x + 1,804 \cdot x^2 + (-1,172) \cdot x^3 \quad (21)$$

$$y = (-7,22 \times 10^{-3}) + 0,294 \cdot x + 2,234 \cdot x^2 + (-1,581) \cdot x^3 \quad (22)$$

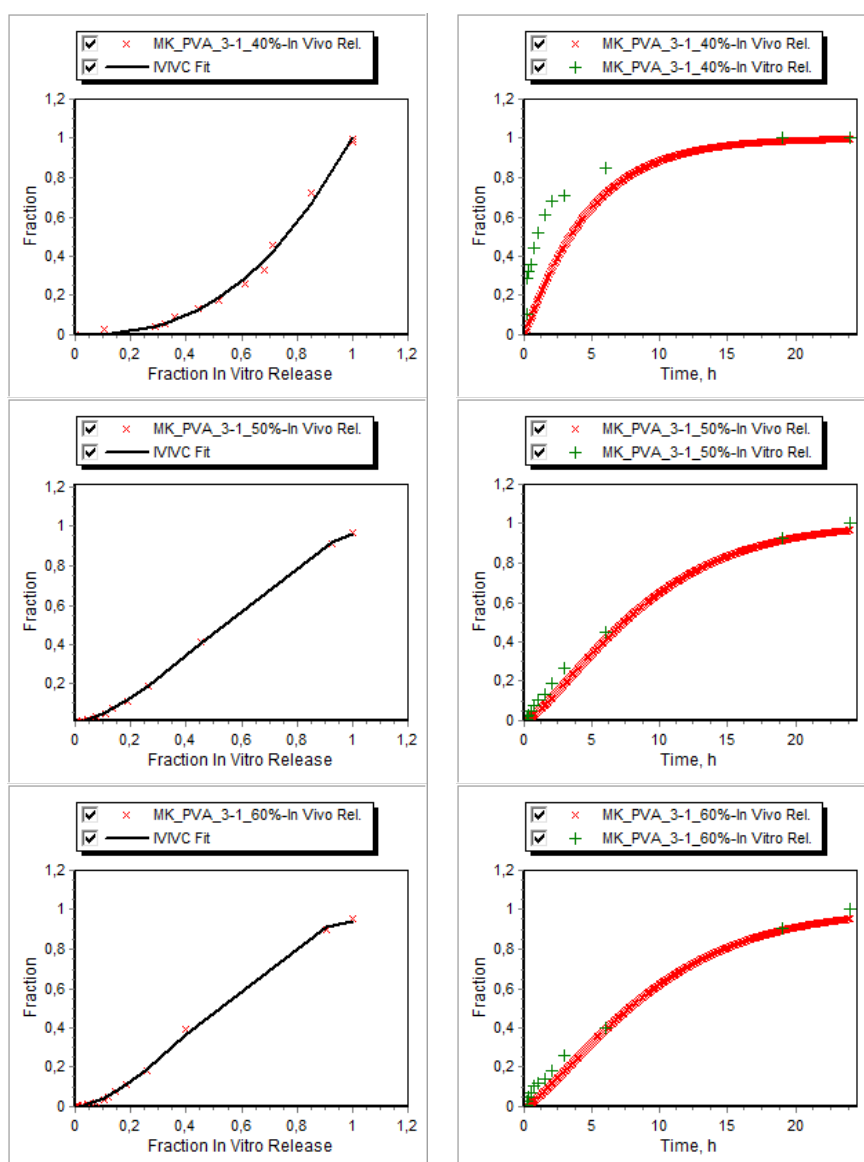
$$y = 1,076 \cdot x^{3,333} \quad (23)$$

$$y = 1,079 \cdot x^{3,928} \quad (24)$$

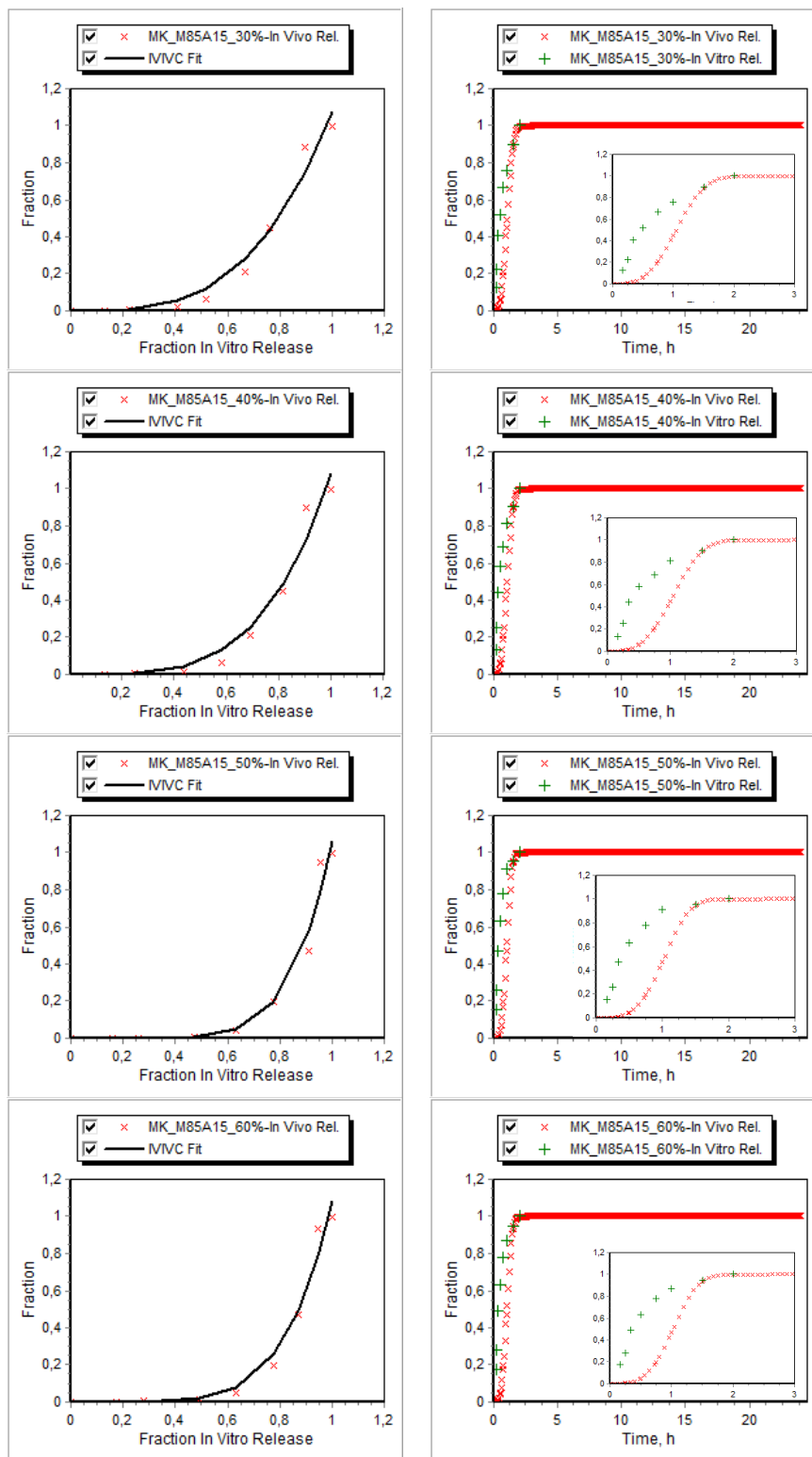
$$y = 1,061 \cdot x^{6,688} \quad (25)$$

$$y = 1,082 \cdot x^{5,691} \quad (26)$$

pri čemu je x udio *in vitro*, a y udio *in vivo* oslobođene djelatne tvari, grafički prikazano slikama 39 i 40, kao i ovisnost udjela oslobođenog o vremenu. Parametri korelacija prikazani su tablicom 25.



Slika 39. Grafički prikaz *in vitro-in vivo* korelacija mikrokapsula oblaganih homopolimerom

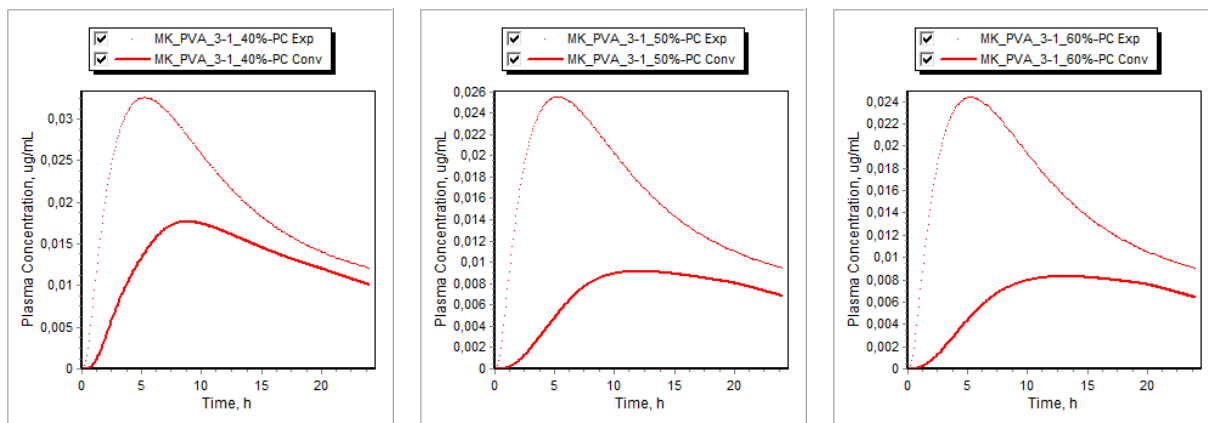


Slika 40. Grafički prikaz *in vitro-in vivo* korelacija mikrokapsula oblaganih kopolimerom

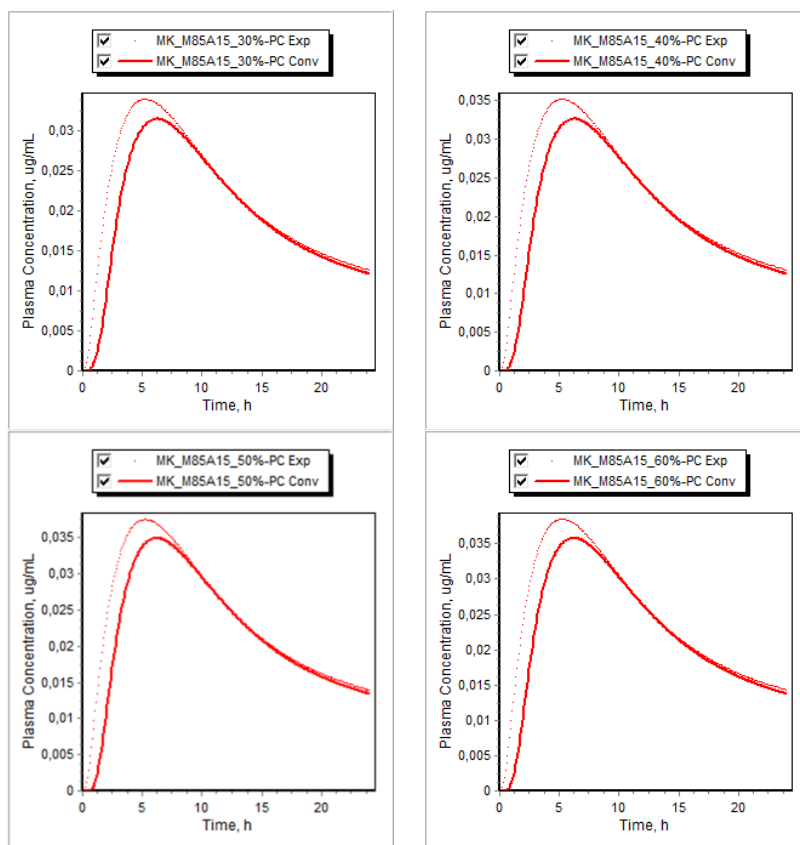
Tablica 25. Parametri korelacija *in vitro* i *in vivo* podataka

Dozirni oblik	R ²	SEP	MAE	AIC
MK_PVA_40%	0,994	0,027	0,020	-56,89
MK_PVA_50%	1,000	$3,62 \times 10^{-3}$	$3,02 \times 10^{-3}$	-104,80
MK_PVA_60%	0,999	0,012	$9,54 \times 10^{-3}$	-74,26
MK_M85A15_30%	0,970	0,063	0,044	-25,96
MK_M85A15_40%	0,965	0,070	0,047	-24,21
MK_M85A15_50%	0,972	0,065	0,037	-25,33
MK_M85A15_60%	0,974	0,062	0,040	-26,27

Profili koncentracija u plazmi u ovisnosti o vremenu dobiven konvolucijom IVIVK i apsolutne bioraspodjelivosti u usporedbi sa simuliranim podacima prikazani su slikama 41 i 42, a parametri usporedbe tablicom 26.



Slika 41. Ovisnost koncentracije u plazmi o vremenu za mikrokapsule oblagane homopolimerom



Slika 42. Ovisnost koncentracije u plazmi o vremenu za mikrokapsule oblagane kopolimerom

Tablica 26. Parametri usporedbe simuliranih podataka i konvolucijskog profila

Dozirni oblik	R ²	SEP	MAE	AIC
MK_PVA_40%	0,446	0,010	$7,96 \times 10^{-3}$	-1038,40
MK_PVA_50%	0,424	0,011	$9,33 \times 10^{-3}$	-975,60
MK_PVA_60%	0,425	0,011	$9,18 \times 10^{-3}$	-989,70
MK_M85A15_30%	0,831	$3,80 \times 10^{-3}$	$1,97 \times 10^{-3}$	-1635,60
MK_M85A15_40%	0,832	$3,91 \times 10^{-3}$	$2,03 \times 10^{-3}$	-1617,10
MK_M85A15_50%	0,841	$4,06 \times 10^{-3}$	$2,09 \times 10^{-3}$	-1595,00
MK_M85A15_60%	0,838	$4,20 \times 10^{-3}$	$2,17 \times 10^{-3}$	-1574,60

Kvantitativna usporedba farmakokinetičkih parametara dobivenih iz simulacije i podataka predviđenih konvolucijom prikazana je tablicom 27.

Tablica 27. Usporedba simuliranih (očekivanih) i konvolucijom predviđenih podataka

Dozirni oblik	c_{\max} [$\mu\text{g/L}$]			AUC [$\mu\text{g}/(\text{mL h})$]		
	Očekivana	Predviđena	Postotak pogreške	Očekivana	Predviđena	Postotak pogreške
MK_PVA_ 40%	0,033	0,018	45,85	0,494	0,303	38,60
MK_PVA_ 50%	0,026	$9,15 \times 10^{-3}$	64,11	0,388	0,164	57,83
MK_PVA_ 60%	0,024	$8,29 \times 10^{-3}$	66,03	0,371	0,150	59,55
MK_M85A15 _30%	0,034	0,032	7,313	0,517	0,470	9,159
MK_M85A15 _40%	0,035	0,033	7,280	0,534	0,487	8,950
MK_M85A15 _50%	0,038	0,035	7,052	0,570	0,521	8,625
MK_M85A15 _60%	0,039	0,036	7,004	0,586	0,534	8,911

5. RASPRAVA

Ispitivana je brzina *in vitro* oslobađanja prema propisanoj FDA metodi za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari dronedaron-hidroklorida (DNR) i izrađene su *in vitro-in vivo* korelacije za komercijalnu tabletu i 18 farmaceutskih alternativa dozirnih oblika: peleta, 3D tiskanih tableta i kapsula te mikrokapsula različitih svojstava. Cilj provedenog istraživanja je ispitati slaganje *in vitro* profila oslobađanja sa simuliranim *in vivo* profilom koncentracije u plazmi kako bi se potvrdile karakteristike ispitanih dozirnih oblika kao alternativa komercijalnoj tableti.

5.1. Komercijalna tableta

In vitro profil oslobađanja za komercijalnu tabletu (Slika 26) pokazuje potpuno oslobađanje tijekom 2 sata, što je jedan od nedostataka komercijalno dostupne tablete i razlog za razvijanje farmaceutskih alternativa s produljenim oslobađanjem. Korelacija *in vitro-in vivo* podataka je potencijnska (jedn. 8), a slaganje podataka vrlo dobro (Tablica 13) što potvrđuje visoka vrijednost koeficijenta determinacije (0,999), ali i drugi parametri korelacije. Manja odstupanja uočena su na samom početku oslobađanja (Slika 27), s obzirom da simulacija predviđa vremensku zadržku u prvih pola sata koju komercijalna tableta nema. Usporedba *in vivo* profila i farmakokinetičkih parametara dobivenih simulacijom i konvolucijom daje vrlo dobro slaganje (Slika 28), što nam potvrđuje ispravnost modela definiranog za simulaciju i pripadne farmakokinetike koja je pogodna za simuliranje ponašanja i ostalih dozirnih oblika.

5.2. Pelete

Pripremljene su tri vrste peleta:

- Porozne pelete na koje je DNR nanesen vakuumskom impregnacijom i oblagane su u 60 ciklusa (nazvane Pelete_Imp_Obl_10%),
- Pelete u koje je DNR ugrađen direktno tijekom ekstrudiranja, a sadrže 15 % DNR i oblagane su u 60 ciklusa (nazvane Pelete_100mg_Obl_10%),
- Pelete u koje je DNR ugrađen direktno tijekom ekstrudiranja, a sadrže 57,15 % DNR i oblagane su u 60 ciklusa (nazvane Pelete_400mg_Obl_10%).

Sve pelete podvrgnute su ispitivanju brzine oslobađanja *in vitro* (Slika 29), punjene u kapsule tako da sadrže 30,60; 35,36 i 257,71 mg DNR po jednoj dozi. Uzorkovanje je provedeno tijekom 3 sata, tijekom kojih je i postignuto potpuno oslobađanje. Pelete_Imp_Obl_10% i Pelete_100mg_Obl_10% nemaju značajnu razliku u sadržaju DNR, ali je vidljivo brže oslobađanje iz impregniranih peleta što je posljedica samog mehanizma oslobađanja. DNR se u impregniranim poroznim peletama deponira unutar pora i na samoj površini zbog čega dolazi do brzog oslobađanja difuzijskim mehanizmom. S druge strane, Pelete_100mg_Obl_10% imaju DNR ugrađen u matricu. Oslobađanje se događa prema modelu međufazne barijere gdje se krutina mora otopiti/degradirati da bi došlo do oslobađanja DNR pa je samim time postupak sporiji. Oslobađanje iz peleta Pelete_400mg_Obl_10% brže je nego kod ostalih peleta unatoč tome što je DNR ugrađen u matricu. Zbog većeg udjela DNR (57,15 %) nije postignuto dobro vezanje između Avicela PH 101, PEG-a i DNR što za posljedicu ima pelete male čvrstoće koje se brzo raspadaju. Također, veći koncentracijski gradijent može dovesti do bržeg oslobađanja. Pelete imaju profil oslobađanja blizak komercijalnoj tableti.

Za sve tri vrste peleta korelacije su potencijske, s manjim razlikama u nagibu (Slika 30), a koeficijenti determinacije u rasponu od 0,977 do 0,992 pokazuju da je slaganje vrlo dobro (Tablica 16). Iz konvolucijskih profila može se uočiti povećanje bioraspoloživosti i AUC za impregnirane pelete i pelete 400 mg u odnosu na simulirane podatke koji predstavljaju ponašanje istog dozirnog oblika jednake mase. Konvolucijski profil predviđa postizanje maksimalne koncentracije nakon 7 sati dok simulirani podaci predviđaju maksimum već nakon 5, odnosno 3,5 sata, a što je u skladu s većom brzinom *in vivo* oslobađanja uočenom kod ovih peleta. Slaganje profila 100 mg peleta je dobro (c_{max} 10,07 %; AUC 11,92 %) i na granicama prihvatljivosti.³⁹

5.3. 3D tiskane tablete

Tehnikom taložnog srašćivanja izrađene su tablete različitih gustoća ispune (25, 50, 75 i 100 %), tako da izgledom i dimenzijama odgovaraju komercijalnoj tableti *Multaq*®.

Brzina oslobađanja DNR iz pripremljenih tableta ispitana je *in vitro* metodom, a ispitivanje se provodilo 28 sati tijekom kojih je došlo do potpune razgradnje tableta. Iz profila oslobađanja (Slika 32) vidljivo je da je postignuto produljeno oslobađanje DNR-a. Tablete različitih

gustoća ispune imaju i različite profile, s time da kod gustoća ispune od 25 i 50 % postoji neznatna razlika, a maksimalna koncentracija postiže se ranije nego kod ostalih. Tableta s 25 % ispune ima krhku, neispunjenu strukturu te čim se razori njena ovojnica, unutrašnjost tablete se brzo raspadne. S druge strane, tableta ispune 100 % ima kompaktnu i popunjenu unutrašnjost, te se tableta postepeno smanjuje i djelatna tvar oslobađa, što uzrokuje sporije oslobađanje djelatne tvari.²⁹ Različitom ispunom tableta tako je moguće jednostavno regulirati brzinu oslobađanja djelatne tvari što je zahtjevnije i teže postići kod tableta koje se dobivaju konvencionalnim načinima proizvodnje.

Izrađene korelacije za manje gustoće ispune (25 i 50 %) su jednadžbe polinoma drugog stupnja, dok su za veće gustoće ispune (75 i 100 %) jednadžbe polinoma trećeg stupnja, što se može pripisati razlici u brzini oslobađanja, a vidljivo je i iz nagiba na grafičkom prikazu *in vitro-in vivo* korelacija (Slika 33). Sve izrađene korelacije imaju vrlo dobro slaganje, visoki koeficijent determinacije (0,995 do 0,999) i male vrijednosti standardne pogreške predviđanja (0,011 do 0,025) (Tablica 19).

Iz grafičkih prikaza ovisnosti koncentracije u plazmi za sve četiri vrste 3D tableta (Slika 34) i parametara usporedbe (Tablica 20) vidljivo je sve manje slaganje simuliranih podataka i konvolucijskog profila s povećanjem gustoće ispune. Udio DNR raste povećanjem gustoće ispune (60,48; 75,24; 81,90 i 97,86 mg) u svim tabletama, pa i očekivane c_{max} vrijednosti lagano rastu. Međutim, konvolucijski profil ne predviđa jednaki porast maksimalne koncentracije zbog čega postotak pogreške između predviđenih i očekivanih podataka također raste s gustoćom ispune tableta. S obzirom da koncentracija u plazmi ovisi o fizikalno-kemijskim karakteristikama lijeka, formulaciji, ali i o otapanju, moguće je utjecati na apsorpciju oblaganjem ili kapsuliranjem lijeka.⁴⁰ Pri izradi 3D tiskanih tableta korišten je PVA kao filament koji je dobro topljiv u vodi i stoga je povoljan materijal za kontrolu oslobađanja, no moguće je da je njegovo korištenje loše za samu apsorpciju lijeka. Samim time, povećanjem gustoće ispune smanjuje se i apsorpcija lijeka i ne dostižu očekivane maksimalne koncentracije u plazmi (Tablica 21).

5.4. 3D tiskane kapsule

Osim tableta kao dozirnih oblika, aditivnom tehnologijom moguće je izraditi i kapsule kao nosače za djelatnu tvar. Izrađene kapsule razlikuju se u debljini stijenke, stoga su analizirane četiri vrste kapsula debljina stijenke od 0,25, 0,50, 0,75 i 1 mm.

Iz grafičkih prikaza ovisnosti udjela oslobođene tvari u vremenu *in vitro* ispitivanja kapsula (Slika 35) vidljivo je različito ponašanje kapsula tijekom vremena. Kapsula s najmanjom debljinom stijenke od 0,25 mm najbrže oslobađa djelatnu tvar, što je i očekivano s obzirom da vrlo tanka i krhka stijenka lako puca i brže se otapa. Deblje stijenke pokazuju sporije i kontroliranije otpuštanje, a sve vrste su u potpunosti oslobodile DNR tijekom 3 sata. Razlike u profilu očituju se u odgodi oslobađanja DNR, od 25 min do 80 min, s povećanjem debljine stijenke.

Jednadžbe koje predstavljaju korelacije za 3D tiskane kapsule su potencijske jednadžbe. Slaganje podataka je lošije za kapsulu s najtanjom stijenkom ($R^2 = 0,703$) (Tablica 22), što se može pripisati manjem broju eksperimentalnih podataka uzrokovanim brzim oslobađanjem, što je vidljivo i iz grafičkog prikaza na slici 36, stoga se takva vrsta ne može opisati pomoću IVIVK. Također, za veće debljine stijenki može se uočiti i stvaranje vremenske zadržke na samom početku oslobađanja, što se poklapa s očekivanim *in vivo* ponašanjem. Koeficijent determinacije za ostale kapsule kreće se u rasponu od 0,980 do 0,998.

Ovisnost koncentracije u plazmi o vremenu (Slika 37) također pokazuje vrlo dobro slaganje za sve vrste kapsula osim za onu s najtanjom stijenkom, kao i usporedba očekivanih i predviđenih farmakokinetičkih parametara (Tablica 24). Takvi rezultati ukazuju na nepovoljnost kapsule s vrlo tankom stijenkom koja nije u mogućnosti osigurati predviđenu maksimalnu koncentraciju lijeka u plazmi, dok ostale vrste jesu. Vremenska zadržka koja je postignuta razvojem ovakvih dozirnih oblika je vrijedno saznanje, s obzirom da se kapsule kao dozirni oblici mogu koristiti za bilo koju vrstu djelatne tvari, kao i za kombiniranje više djelatnih tvari.

5.5. Mikrokapsule

Procesom sušenja raspršivanjem izrađene su mikrokapsule DNR obložene homopolimerom PVA i kopolimerom M85A15 pri tri, odnosno četiri protoka zraka za raspršivanje (Tablica 7 i

9). Protok zraka za raspršivanje utječe na veličinu kapljica koje se sušenjem pretvaraju u mikrokapsule, stoga su manjim protocima zraka dobivene veće, a većim protocima zraka manje kapsule. Omjer polimer:DNR je u svim mikrokapsulama jednak, a iznosi 3:1.

Rezultati *in vitro* ispitivanja oslobađanja za mikrokapsule oblagane PVA pokazuju različite profile oslobađanja (Slika 38). Mikrokapsule najveće veličine (MK_PVA_3-1_40%) imaju brže, a one manjih veličina (MK_PVA_3-1_50% i MK_PVA_3-1_60%) sporije otpuštanje. Razlog takvog ponašanja je morfologija mikrokapsula³² dobivenih protokom zraka od 50 i 60 % koje su slijepljene i spojene u aglomerate. Velika količina slijepljenog polimera duže se otapa pa je oslobađanje DNR sporije. Razlika u ponašanju vidljiva je i iz korelacija (Slika 39), gdje se uočava sporije, ali i kontroliranije otpuštanje DNR iz mikrokapsula s protocima zraka od 50 i 60 %, pri čemu korelacije u obliku polinoma trećeg stupnja vrlo dobro opisuju podatke (Tablica 25).

Svi profili *in vitro* oslobađanja za mikrokapsule oblagane kopolimerom M85A15 (Slika 38) prate isti trend tijekom 2 sata ispitivanja oslobađanja, vrlo sličan onom za komercijalnu tabletu *Multaq*[®], prikazanom na slici 26. Korelacije *in vitro-in vivo* podataka su potencijske funkcije, uz nešto manje vrijednosti R^2 nego za mikrokapsule PVA, ali zadovoljavajuće u rasponu od 0,965 do 0,974 (Tablica 25). Razlog tome je odstupanje *in vitro* oslobađanja od tijeka previđenog *in vivo* ponašanja na samom početku ispitivanja, pri čemu *in vitro* ponašanje pokazuje brže oslobađanje vidljivo iz nagiba krivulje u tom dijelu (Slika 40).

Ovisnost koncentracije u plazmi o vremenu za mikrokapsule oblagane homopolimerom (Slika 41) pokazuje sustavno odstupanje od previđenog ponašanja. S obzirom da su ostale mikrokapsule oblagane u istim uvjetima, a ne pokazuju takve anomalije (Slika 42) možemo zaključiti kako je upravo homopolimer PVA uzrok tome. Naime, PVA je topljiv u vodi, a slabije topljiv u fosfatnom puferu, što je rezultiralo produljenim oslobađanjem, no nije povoljno za apsorpciju lijeka kako je već napomenuto kod 3D tiskanih tableta. Postotak pogreške pri usporedbi farmakokinetičkih parametara (Tablica 27) je velik (c_{max} do 66,03 %; AUC do 59,55 %), što nam potvrđuje nepovoljna svojstva ovog polimera.

Metakrilatni kopolimer M85A15 je hidrofilno-hidrofobni sustav koji ima vrlo dobro ponašanje u uvjetima ispitivanja. S obzirom da je izrađen upravo za izradu mikrokapsula sušenjem raspršivanjem i ispitivanje ponašanja DNR u fosfatnom puferu, zadovoljava svojstva topljivosti u etanolu ili acetonu, bubrenja u vodi, staklišta je iznad 40 °C i pogodne viskoznosti.³⁷ Ovisnost koncentracije u plazmi o vremenu (Slika 42) je gotovo u potpunosti

jednaka procijenjenom *in vivo* profilu. Samim time postignuti su i očekivani farmakokinetički parametri (Tablica 27), a pogreška je manja od 10 %.

Usporedba farmakokinetičkih parametara dobivenih simulacijom i konvolucijom pokazala je zadovoljavajuće slaganje za sljedeće dozirne oblike: Pelete_100mg_Obl_10%; 3D_Tablete_25%, 3D_Tablete_50%, 3D_Kapsule_0,25mm, 3D_Kapsule_0,50mm, 3D_Kapsule_0,75mm, MK_M85A15_30%, MK_M85A15_40%, MK_M85A15_50% i MK_M85A15_60%. Međutim, kod svih ovih dozirnih oblika može se uočiti da simulirani podaci daju veće vrijednosti maksimalne koncentracije DNR u plazmi kao i njezino ranije postizanje od onog predviđenog konvolucijskim modelom. Razlog tome je razlika eksperimentalnih uvjeta i uvjeta simulacije. Eksperimentalni profili *in vitro* oslobađanja dobiveni su u fosfatnom puferu pH = 4,5 kao mediju koji oponaša uvjete u dvanaesniku, mjestu oslobađanja DNR. Simulacije su pak izrađene za uvjete sitosti u ljudskom organizmu sukladno uvjetima ispitivanja farmakokinetike DNR. Brzina oslobađanja DNR u fosfatnom puferu veća je od one u biorelevantnim fluidima što ima za posljedicu određene razlike između *in vitro* i *in vivo* ponašanja ispitanih dozirnih oblika.

6. ZAKLJUČAK

Iz *in vitro* profila oslobađanja i simuliranih *in vivo* podataka izrađene su korelacije koje pokazuju karakteristike ispitanih farmaceutskih alternativa. Vrlo dobro slaganje simulacije s profilom oslobađanja za komercijalnu tabletu potvrđuje ispravnost parametara simulacije i pripadne farmakokinetike. S obzirom da je brzina oslobađanja DNR u uvjetima ispitivanja (fosfatnom puferu) veća od one u uvjetima simulacije (ljudskom organizmu), za sve rezultate postoje određena odstupanja.

Slaganje farmakokinetičkih podataka dobivenih konvolucijom podataka za impregnirane i obložene pelete s manjom dozom DNR (35,36 mg) je vrlo dobro i u granicama prihvatljivosti ($\leq 10\%$), stoga izrađene korelacije mogu služiti kao podloga za predviđanje ponašanja tog dozirnog oblika. Ostali oblici nemaju povoljne karakteristike.

3D tiskane tablete različitih gustoća ispune ne dostižu očekivane farmakokinetičke parametre što može biti uzrokovano korištenim filamentom (PVA) pri izradi tih dozirnih oblika. Ipak, tablete s najmanjom gustoćom ispune imaju pogreške u vrijednostima farmakokinetičkih parametara (10 – 20 %) koje ne ukazuju na uvjerljivu predvidljivost, no mogu se uzeti kao početna točka za daljnje istraživanje.

Kapsule različitih debljina stijenke izrađene aditivnom tehnologijom ostvaruju vremensku zadržku predviđenu simulacijom, a ovisnost koncentracije u plazmi o vremenu pokazuje vrlo dobro slaganje za sve vrste kapsula osim za onu s najtanjom stijenkom.

Rezultati istraživanja za mikrokapsule kao dozirni oblik razlikuju se s obzirom na polimer korišten za oblaganje. Mikrokapsule oblagane homopolimerom PVA pokazuju sustavno odstupanje od predviđenog ponašanja, dok mikrokapsule oblagane metakrilatnim kopolimerom imaju gotovo potpuno slaganje ispitivanih i simuliranih podataka te očekivanih farmakokinetičkih parametara, a samim time izrađene korelacije su ispravne za predviđanje ponašanja tih dozirnih oblika.

Korelacije izrađene za dozirne oblike koje zadovoljavaju uvjete prihvatljivosti farmakokinetičkih parametara su višestruke korelacije razine C.

7. LITERATURA

1. S. Kopp, World Health Organization Definition of Active Pharmaceutical Ingredient, Working document QAS/11.426/Rev.1, 2011.
2. J. A. Mohammad, Introduction to dosage forms, Pharmaceutics II, College of Pharmacy, Prince Sattam Bin Abdulaziz Univesity, Al-Kharj, 2015.
3. Pravilnik o ispitivanju bioraspoloživosti i bioekvivalenciji lijekova, NN 20/99
4. R. Gold, Toward a new era of intellectual property: from confrontation to negotiation, Report, International Expert Group on Biotechnology, Innovation and Intellectual Property, Montréal, 2008.
5. P. Grootendorst, A. Hollis, D. K. Levine, T. Pogge, A. M. Edwards, New approaches to rewarding pharmaceutical innovation, *Can. Med. Assoc. J.* 183 (2011) 681-685.
6. <https://www.britannica.com/technology/pharmaceutical-industry> (pristup: 27. travnja 2020.)
7. I. Brizić, Otkrivanje i razvoj lijekova, Predavanja iz kolegija Farmakologija, Sveučilište u Mostaru, Mostar, 2020.
8. G. B. Katzung, S. B. Masters, A. J. Trevor, Basic and clinical pharmacology, Vol.11, The McGraw-Hill Companies, New York, 2009.
9. <http://www.onkologija.hr/lijecenje-raka/klinicka-ispitivanja/> (pristup: 26. travnja 2020.)
10. S. Mignani, S. Huber, H. Tomas, J. Rodrigues, J. P. Majoral, Why and how have drug discovery strategies in pharma changed? What are the new mindsets?, *Drug Discov. Today* 21 (2016) 239-249
11. M. L. Kregar, Razvoj *in vitro* metode za ispitivanje oslobađanja djelatne tvari iz polimernih mikročestica za topičku primjenu, Doktorski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2016.
12. P. Costa, J. M. Sousa Lobo, Modeling and comparison of dissolution profiles, *Eur. J. Pharm. Sci.* 13 (2001) 123–133
13. J. Siepmann, F. Siepmann, Mathematical modeling of drug dissolution, *Int. J. Pharm.* 453 (2013) 12-24
14. W. I. Higuchi, Diffusional models useful in biopharmaceutics drug release rate processes, *J. Pharm. Sci.* 56 (1967) 315-324
15. G. Singhvi, M. Singh; Review: In-vitro drug relase characterization models, *Int. J. Pharm. Stud. Res.* 2 (2011) 77–84

16. J. Krämer, L. T. Grady, J. Gajendran, Historical development of dissolution testing, *Pharmaceutical Dissolution Testing*, Taylor & Francis, New York, SAD, 2005.
17. J. Emami, In vitro – In vivo Correlation: From Theory to Applications, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 9 (2006) 169–189
18. United States Pharmacopoeia, In vitro and In vivo Evaluations of Dosage Forms, Mack Publishing Co., Easton, 2004.
19. Guidance for industry; Extended release oral dosage forms: development, evaluation and application of an in vitro/in vivo correlation, FDA, CDER, 1997.
20. S. Bolton, Correlation in Pharmaceutical Statistics: Practical and Clinical Applications, Marcel Dekker Inc., New York, 1991.
21. E. S. Kostewicz, B. Abrahamsson, M. Brewster, J. Brouwers, J. Butler, S. Carlert, P. A. Dickinson, J. Dressman, R. Holm, S. Klein, J. Mann, M. McAllister, M. Minekus, U. Muenster, A. Müllertz, M. Verwei, M. Vertzoni, W. Weitschies, P. Augustijns, In vitro models for prediction of in vivo performance of oral dosage forms, *Elsevier B.V.* 57 (2014) 342-366
22. C. Caspari, A treatise on Pharmacy, Lea Bros., Philadelphia, 1895.
23. E. S. Kostewicz, L. Aarons, M. Bergstrand, M. B. Bolger, A. Galetin, O. Hatley, M. Jamei, R. Lloyd, X. Pepin, A. Rostami-Hodjegan, E. Sjögren, C. Tannergren, D. B. Turner, C. Wagner, W. Weitschies, J. Dressman, PBPK models for the prediction of in vivo performance of oral dosage forms, *Eur. J. Pharm. Sci.* 57 (2014) 300-321
24. J. M. Cardot, E. Beyssac, M. Alric, In Vitro-In Vivo Correlation: Importance of Dissolution in IVIVC, *Diss. Techn.* 2 (2007) 15-19
25. D. Verbanac, V. Stepanić, Novi pogled na istraživanje lijekova – nove formulacije i kombinacije, *Farmaceutski tehničar: stručno informativni časopis farmaceutskih tehničara Hrvatske* 63 (2013) 7-12
26. T. R. Shaw, K. Raymond, M. R. Howard, J. Hamer, Therapeutic non-equivalence of digoxin tablets in the United Kingdom: correlation with tablet dissolution rate, *Br. Med. J.* 4 (1973) 763-766
27. M. Hirjau, A. C. Nicoara, V. Hirjau, D. Lupuleasa, Pelletization Techniques used in pharmaceutical fields, *Practica Farm.* 4 (2011) 206–211
28. M. Štanfel, Proizvodnja farmaceutskih peleta, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2019.
29. K. Kezerić, 3D-tiskani oralni dozirni oblici dronedaron-hidroklorida, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2019.

30. B. Redwood, Additive Manufacturing Technologies: An Overview, 3D Hubs
URL: <https://www.3dhubs.com/knowledge-base/additive-manufacturing-technologies-overview> (pristup: 27. srpnja 2020.)
31. M. Celik, S.C. Wendel, Spray Drying and Pharmaceutical Applications. Patikh, D.M., ur., Handbook of Pharmaceutical Granulation Tehnology (Second Edition), Taylor & Francis, 2005
32. J. Petanjek, Mikrokapsuliranje djelatne tvari polimerima, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2019.
33. M. Leskovar, A. Matal, Mikrokapsuliranje djelatne tvari metakrilatnim kopolimerima, Kemijsko-inženjerske vježbe, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2019.
34. F. Iram, S. Ali, A. Ahmad, S. A. Khan, A. Husain, A review on dronedarone: Pharmacological, pharmacodynamic and pharmacokinetic profile, J. Acute Disease 5 (2016) 102-108.
35. <http://struna.ihjj.hr/naziv/konvolucija/19228/> (pristup: 28. srpnja 2020.)
36. A.R. Rajabi-Siahboomi, Overview of Multiparticulate Systems for Oral Drug Delivery, Multiparticulate Drug Delivery; Formulation, Processing and Manufacturing, Springer, 2017.
37. J. Sacher, M. Vučetić, Sinteza i karakterizacija metakrilatnih kopolimera za oblaganje farmaceutika, Kemijsko-inženjerske vježbe, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2019.
38. GastroPlusTM, Software manual, Simulations Plus, Inc., 2019.
39. Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation, and Application of In Vitro/In Vivo Correlations, Guidance for Industry, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, 1997.
40. J. Le, Drug Absorption, Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University of California, San Diego, 2019.