

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET

Biljana B. Gatarić

Primena tehnika za naprednu analizu podataka  
u biofarmaceutskoj karakterizaciji lekova:  
identifikacija, klasifikacija i predviđanje faktora  
koji utiču na intestinalnu apsorpciju lekovitih  
supstanci

doktorska disertacija

Beograd, 2021



UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET

Biljana B. Gatarić

Primena tehnika za naprednu analizu podataka  
u biofarmaceutskoj karakterizaciji lekova:  
identifikacija, klasifikacija i predviđanje faktora  
koji utiču na intestinalnu apsorpciju lekovitih  
supstanci

doktorska disertacija

Beograd, 2021





UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF PHARMACY

Biljana B. Gatarić

Application of advanced data analysis techniques  
in biopharmaceutical characterization:  
identification, classification and prediction of  
factors affecting intestinal drug absorption

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021



Doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta.

**Mentor**

---

Dr sc. Jelena Parojčić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski  
fakultet

**Članovi komisije:**

---

Dr sc. Sandra Cvijić, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski  
fakultet

---

Dr sc. Žarko Gagić, docent  
Univerzitet u Banjoj Luci – Medicinski  
fakultet

Datum odbrane \_\_\_\_\_



## **ZAHVALNICA**

*Neizmernu zahvalnost dugujem svom mentoru prof. dr Jeleni Parojčić na velikoj podršci, koju sam imala od samog početka, ličnom angažovanju, izdvojenom vremenu, korisnim savetima kako tokom eksperimentalnog rada, tako i tokom tumačenja rezultata, kao i na ohrabrivanju kada god je to bilo potrebno.*

*Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr Sandri Cvijić na nesebičnoj i ogromnoj pomoći u ekperimentalnom delu koji se odnosi na fiziološki zasnovano farmakokinetičko modelovanje.*

*Hvala doc. dr Žarki Gagiću na korisnim savetima i podršci tokom pisanje ove doktorske disertacije.*

*Hvala mojim dragim kolegama i prijateljima sa studijskog programa Farmacija Medicinskog fakulteta u Banjoj Luci što su uvijek bili tu za mene da me saslušaju i ohrabre.*

*Hvala dragoj tetki Vesni, baki i dedi što su me uvek rado primili u svoj dom tokom mog boravka u Beogradu.*

*Najveću zahvalnost dugujem svojim najmilijima, majci Božici, ocu Bošku, bratu Dušku i suprugu Nebojši, na neizmornoj i безусловnoj ljubavi, podršci, razumevanju, ohrabrenju i što su svaki moj težak trenutak proživeli sa mnom i pomogli mi da dođem do cilja.*



# PRIMENA TEHNIKA ZA NAPREDNU ANALIZU PODATAKA U BIOFARMACEUTSKOJ KARAKTERIZACIJI LEKOVA: IDENTIFIKACIJA, KLASIFIKACIJA I PREDVIĐANJE FAKTORA KOJI UTIČU NA INTESTINALNU APSORPCIJU LEKOVITIH SUPSTANCI

## Sažetak

Apsorpcija lekovite supstance iz gastrointestinalnog trakta zavisi od brojnih međusobno povezanih fizičko-hemijskih, fizioloških, biofarmaceutskih i farmaceutsko-tehnoloških faktora. Primena savremenih tehnika za naprednu analizu podataka može da doprinese mehanističkom razumevanju fenomena uključenih u apsorpciju lekova i identifikaciji faktora od kojih ona zavisi. Osnovni cilj istraživanja bio je procena mogućnosti primene različitih tehnika za naprednu analizu podataka u biofarmaceutskoj karakterizaciji lekova kroz razvoj i validaciju modela za predviđanje permeabilnosti, identifikaciju kritičnih vrednosti faktora od kojih zavisi apsorpcija i mogućnost predviđanje uticaja hrane.

Napredna analiza podataka sprovedena je na uzorku od 128 model supstanci grupisanih u tri seta podataka na osnovu opsežne analize dostupnih informacija o njihovim fizičko-hemijskim, biofarmaceutskim i farmakokinetičkim karakteristikama. Primenom hijerarhijskog klasterovanja na glavnim komponentama pokazano je da je permeabilnost najvažniji faktor za predviđanje apsorpcije lekovitih supstanci nakon oralne primene. Kao osnov za klasifikaciju identifikovane su dve vrednosti koeficijenta permeabilnosti,  $1 \times 10^{-4}$  i  $2,7 \times 10^{-4}$  cm/s, što ukazuje na ternerni sistem klasifikacije i postojanje posebne grupe lekovitih supstanci sa umerenom permeabilnošću. Primenom algoritma slučajnih šuma razvijen je i validiran model koje je pokazao umerenu sposobnost predviđanja efekta hrane na apsorpciju ( $\kappa$  vrednost  $> 0,4$ ).

Četiri lekovite supstance za koje se u literaturi navodi da pokazuju nisku rastvorljivost i nisku permeabilnost (aciklovir, furosemid, valsartan i norfloksacin) su okarakterisane primenom fiziološki zasnovanih farmakokinetičkih modela u kombinaciji sa rezultatima *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja. Dobijeni rezultati ukazuju da su postojeći kriterijumi na kojima se zasniva procena rastvorljivosti u okviru Biofarmaceutskog sistema klasifikacije previše strogi i da ih je potrebno modifikovati kako bi se uspostavile biorelevantne granične vrednosti i kriterijumi za klasifikaciju lekova.

**Ključne reči:** napredna analiza podataka, biofarmaceutska karakterizacija, apsorpcija, permeabilnost, rastvorljivost, uticaj hrane, fiziološki zasnovano farmakokinetičko modelovanje

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Farmaceutska tehnologija





# APPLICATION OF ADVANCED DATA ANALYSIS TECHNIQUES IN BIOPHARMACEUTICAL CHARACTERIZATION: IDENTIFICATION, CLASSIFICATION AND PREDICTION OF FACTORS AFFECTING INTESTINAL DRUG ABSORPTION

## Abstract

The absorption of drugs from gastrointestinal tract depends on a number of interrelated physicochemical, physiological, biopharmaceutical and formulation factors. The application of modern advanced data analysis techniques can contribute to a mechanistic understanding of the phenomena involved in drug absorption and the identification of the factors on which it depends. The main goal of the research was to evaluate the possibility of applying different advanced data analysis techniques in biopharmaceutical characterization of drugs through the development and validation of models for predicting permeability, identification of critical values of factors on which absorption depends and the possibility of predicting food effects. Advanced data analysis was performed on a sample of 128 model drug substances grouped into three data sets based on the extensive analysis of the available data on their physicochemical, biopharmaceutical and pharmacokinetic characteristics. The application of hierarchical clustering on principal components has shown that permeability is the most important factor for predicting the absorption of drugs after oral administration. Two values of the permeability coefficient,  $1 \times 10^{-4}$  and  $2.7 \times 10^{-4}$  cm/s, were identified as the basis for classification, which indicates the ternary classification system and the existence of a separate group of drugs with moderate permeability. Using a random forest algorithm, the model was developed and validated that showed a moderate ability to predict the effect of food on absorption (kappa value  $> 0.4$ ).

Four drugs reported in the literature to show low solubility and low permeability (acyclovir, furosemide, valsartan and norfloxacin) were characterized using physiologically based pharmacokinetic models in combination with the results of *in vitro* dissolution studies. The obtained results indicate that the existing criteria on which the solubility assessment is based within the Biopharmaceutical Classification System are too conservative and would need to be modified in order to establish biorelevant limit values and criteria for drug classification.

**Keywords:** advanced data analysis techniques, biopharmaceutical characterization of drugs, drug absorption, permeability, solubility, food effect, physiologically based pharmacokinetic modeling

**Scientific field:** Pharmacy

**Specific scientific field:** Pharmaceutical technology



## Sadržaj:

I OPŠTI DEO .....	1
1. BIOFARMACEUTSKA KARAKTERIZACIJA LEKOVA .....	3
1.1. Apsorpcija lekova iz gastrointestinalnog trakta.....	3
1.1.1. Biofarmaceutski faktori koji utiču na apsorpciju lekovite supstance .....	4
1.1.2. Fizičko-hemijski faktori koji utiču na apsorpciju lekovite supstance .....	5
1.1.3. Fiziološki faktori .....	7
1.1.4. Farmaceutsko-tehnološki faktori .....	11
1.1.5. Uticaj hrane .....	12
1.1.6. Veza između apsorpcije i bioraspoloživosti lekovite supstance .....	15
1.2. Biofarmaceutska klasifikacija lekovitih supstanci.....	16
1.2.1. Modifikacije Biofarmaceutskog sistema klasifikacije.....	16
1.3. Predviđanje uticaja hrane na apsorpciju lekova.....	17
1.3.1. Primena <i>in vitro</i> metoda za procenu uticaja hrane.....	18
1.3.2. Primena fiziološki zasnovanih farmakokinetičkih modela za predviđanje uticaja hrane .....	20
2. NAPREDNA ANALIZA PODATAKA.....	23
2.1. Pregled tehnika za naprednu analizu podataka .....	23
2.1.1. Veštačke neuronske mreže .....	23
2.1.2. Hijerarhijsko klasterovanje na glavnim komponentama .....	24
2.1.3. Stablo odlučivanja .....	24
2.1.4. Algoritam potpornih vektora sa polinomalnom kernel funkcijom .....	25
2.1.5. Algoritam slučajnih šuma .....	25
2.2. Primena tehnika za naprednu analizu podataka u razvoju i karakterizaciji lekova .....	26
3. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	27
II EKSPERIMENTALNI DEO .....	29
4. MATERIJALI I METODE.....	31
4.1. Formiranje baze podataka.....	31
4.2. Napredna analiza podataka .....	32
4.2.1. Razvoj i validacija modela za predviđanje intestinalne permeabilnosti u ljudi.....	32
4.2.2. Klasterovanje podataka .....	32
4.2.3. Razvoj i validacija modela za predviđanje uticaja hrane na intestinalnu apsorpciju lekova .....	34
4.3. Biofarmaceutska karakterizacija lekovitih supstanci koje pokazuju nisku rastvorljivost i nisku permeabilnost .....	34
4.3.1. <i>In vivo</i> podaci .....	34
4.3.2. <i>In vitro</i> ispitivanje brzine rastvaranja .....	35
4.3.3. Ispitivani preparati.....	36

4.3.4. Razvoj fiziološki zasnovanih farmakokinetičkih modela .....	36
5. REZULTATI I DISKUSIJA .....	39
5.1. Baza podataka .....	39
5.1.1. Set podataka A .....	39
5.1.2. Set podataka B .....	39
5.1.3. Set podataka C .....	39
5.2. Napredna analiza podataka .....	45
5.2.1. Model za predviđanje intestinalne permeabilnosti u ljudi .....	45
5.2.2. Klaster analiza seta podataka A .....	49
5.2.3. Klaster analize setova podataka B i C .....	55
5.3. Modeli za predviđanje uticaja hrane na intestinalnu apsorpciju lekova .....	76
5.4. Biofarmaceutska karakterizacija lekovitih supstanci koje pokazuju nisku rastvorljivost i nisku permeabilnost .....	82
5.4.1. Aciklovir .....	82
5.4.2. Furosemid .....	97
5.4.3. Valsartan .....	113
5.4.4. Norfloksacin .....	129
5.4.5. Uporedna analiza rezultata biofarmaceutske karakterizacije ispitivanih model supstanci .....	145
6. ZAKLJUČCI .....	145
7. LITERATURA .....	155

# I OPŠTI DEO



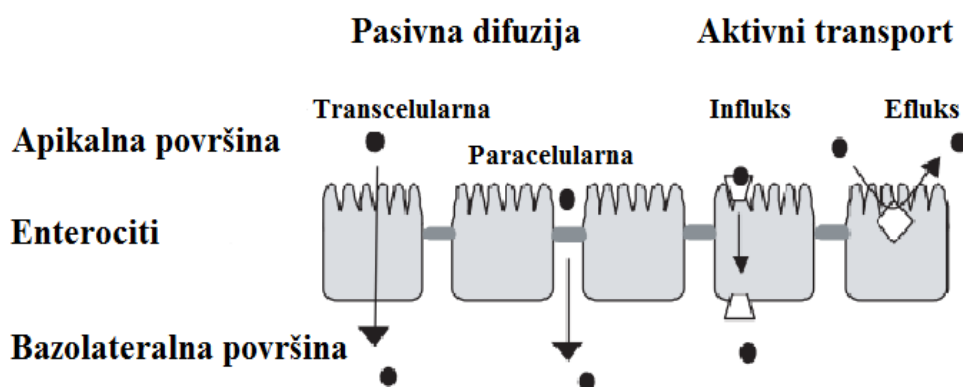
# 1. BIOFARMACEUTSKA KARAKTERIZACIJA LEKOVA

Biofarmaceutska karakterizacija lekova obuhvata različita *in vivo*, *in vitro* i *in silico* ispitivanja velikog broja različitih faktora s ciljem procene, modelovanja i predviđanja apsorpcije lekova (1, 2). Poznavanje ovih faktora i njihovih međusobnih interakcija je ključno za mehanističko razumevanje procesa apsorpcije.

## 1.1. Apsorpcija lekova iz gastrointestinalnog trakta

Preduslov za sistemsko terapijsko dejstvo oralno primenjene lekovite supstance je njena apsorpcija iz gastrointestinalnog trakta. Apsorpcija lekovite supstance iz lumena gastrointestinalnog trakta uključuje oslobađanje lekovite supstance iz farmaceutskog oblika leka, njeno rastvaranje i transport kroz intestinalnu membranu. Ishod ovog procesa zavisi od vrlo kompleksnog uzajamnog dejstva faktora koji zavise od uslova u gastrointestinalnom traktu, karakteristika farmaceutskog oblika leka i lekovite supstance (3).

Većina lekovitih supstanci se primarno apsorbuje u tankom crevu. Međutim, tačno mesto apsorpcije zavisi od fizičko-hemijskih osobina lekovite supstance, farmaceutskog oblika leka i mehanizama koji su uključeni u proces apsorpcije lekovite supstance (4, 5). Da bi dospela u sistemsku cirkulaciju, lekovita supstanca mora da prođe kroz nepokretni vodeni i mukusni sloj, koji se nalaze na površini epitelne membrane, kao i sloj ćelija epitela. Najčešći mehanizmi apsorpcije lekovite supstance su transcelularna difuzija, paracelularna difuzija, te efluks- i influks- posredovani transport, koji se odvijaju posredstvom transportnih proteina (Slika 1).

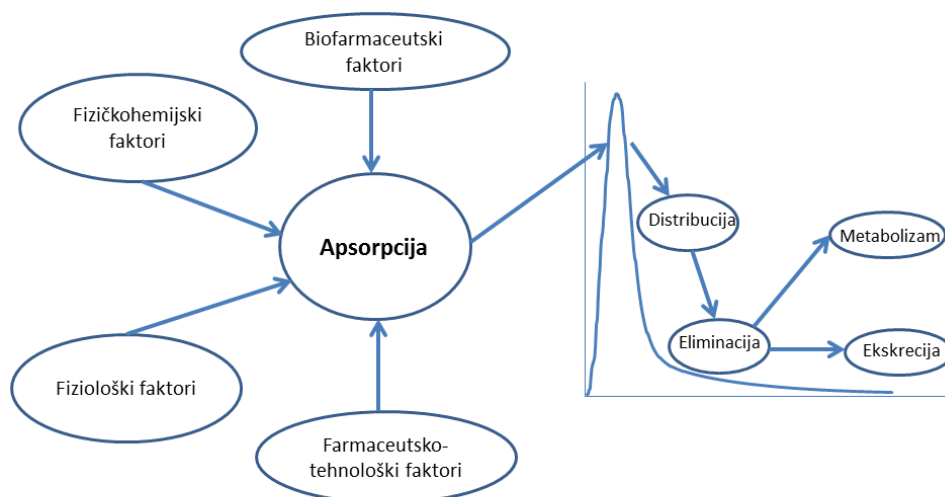


Slika 1. Najčešći mehanizmi apsorpcije lekovite supstance (6)

Pasivna difuzija je najčešći mehanizam apsorpcije kroz intestinalnu membranu. Paracelularna difuzija podrazumeva prolazak lekovite supstance kroz vodom ispunjene pore u međućelijskim vezama enterocita. Na ovaj način se generalno apsorbuju hidrofilne lekovite supstance ( $\log P < 0$ ), male molekulske mase ( $MW < 250$ ). S obzirom na to da su pore u međućelijskim vezama negativno naelektrisane, olakšan je prolazak pozitivno naelektrisanih molekula (7). Interesantno je istaći da paracelularni put ima ograničen kapacitet zbog sužavanja međućelijskih veza enterocita duž gastrointestinalnog trakta, od jejunuma prema kolonu (8). Dakle, značaj paracelularnog puta apsorpcije je minimalan zbog uskih međućelijskih veza, ali i zbog male površine, koja obuhvata svega  $\sim 0,01\%$  od ukupne površine intestinalne membrane. Stoga, lekovite supstance koje se apsorbuju paracelularnim putem pokazuju dozno- ili regionalno-zavisnu apsorpciju. Transcelularna (pasivna) difuzija zahteva prolazak lekovite supstance kroz lipidnu ćelijsku membranu intestinalnih enterocita. Lekovite supstance koje se apsorbuju transcelularnim putem su nejonizovane, lipofilne supstance ( $\log P > 0$ ) i imaju molekulska masu veću od 300 Da (9). Aktivni transport lekovite

supstance kroz intestinalnu membranu se odvija posredstvom transportnih proteina i može biti usmeren ka ćeliji (influks) ili iz ćelije (efluks). Značaj aktivnog transporta za apsorpciju zavisi od osobina lekovite supstance i njenog afiniteta prema transportnim proteinima. Smatra se da su skoro sve lekovite supstance supstrati za neku vrstu transportnih proteina (10) tj. postoje jaki dokazi koji sugerišu da je u proces apsorpcije velikog broja lekovitih supstanci istovremeno uključeno više različitih mehanizama (11-13).

Apsorpcija lekovite supstance je kompleksan proces, koji, kao što je već pomenuto, zavisi od brojnih, međusobno povezanih, fizičko-hemijskih, fizioloških, biofarmaceutskih i farmaceutsko-tehnoloških faktora čiji uticaji i međusobne interakcije nisu u potpunosti ispitani (Slika 2).



Slika 2. Faktori koji utiču na apsorpciju lekovite supstance

### 1.1.1. Biofarmaceutski faktori koji utiču na apsorpciju lekovite supstance

Intestinalna permeabilnost i rastvorljivost lekovite supstance u biološkim tečnostima su prepoznati kao ključni biofarmaceutski faktori od kojih zavisi apsorpcija lekovite supstance. Proces apsorpcije lekovite supstance se najjednostavnije može predstaviti pomoću jednačine izvedene iz prvog Fikovog zakona:

$$J = P_{\text{eff}} * \Delta C * A \quad \text{[jednačina 1]}$$

gde je: J - brzina apsorpcije lekovite supstance (apsorptivni fluks) kroz homogenu intestinalnu membranu,  $P_{\text{eff}}$  – efektivna permeabilnost kroz humani jejunum (cm/s),  $\Delta C$  - koncentracioni gradijent kroz intestinalnu mukozu (mM/cm<sup>3</sup>) i A je intestinalna površina dostupna za apsorpciju (cm<sup>2</sup>). Kao što se može videti iz jednačine 1, rastvorljivost i permeabilnost su međusobno povezane i utiču na apsorptivni fluks od kojeg zavisi brzina apsorpcije i količina lekovite supstance apsorbovane iz gastrointestinalnog trakta (GIT) (9).

Lekovita supstanca se mora rastvoriti u luminalnoj tečnosti GIT-a da bi bila raspoloživa za apsorpciju. Rastvorljivost se definiše kao maksimalna količina supstance koja se može rastvoriti u određenoj količini rastvarača (koncentracija zasićenja) na određenoj temperaturi. Proces rastvaranja je uslovljen nizom faktora, kao što su energija kristalne rešetke, energija formiranja šupljine u rastvaraču i energija solvatacije. Ukupna energija procesa rastvaranja zavisi od prevazilaženja intermolekulskih i intramolekulskih sila između molekula lekovite supstance i između molekula rastvarača (gastrointestinalna tečnost) i stvaranja novih intermolekulskih interakcija između



molekula lekovite supstance i gastrointestinalne tečnosti, što konačno rezultira rastvaranjem; supstanca postaje dostupna za apsorpciju. Rastvaranje je termodinamički proces, koji zavisi od fizičko-hemijskih osobina supstance i fizioloških faktora kao što su pH vrednost, jonska jačina, puferski kapacitet i sastav gastrointestinalnih tečnosti. Ograničena rastvorljivost može dovesti do niske i varijabilne apsorpcije tj. ona može da bude ograničavajući faktor za proces apsorpcije. Poboljšanje biološke raspoloživosti nisko rastvorljivih lekovitih supstanci postaje predmet intenzivnih istraživanja sa porastom broja novosintetisanih farmakološki aktivnih jedinjenja, koja su praktično nerastvorljiva u vodi (14, 15).

Intestinalna permeabilnost lekovite supstance predstavlja pokazatelj brzine njenog transporta kroz intestinalnu membranu imajući u vidu sumu svih puteva transporta (16):

$$\frac{dM}{dt} = A * (P_{pt} + P_{at}) * C = A * P_{pt} * C + \frac{V_{max} * C}{K_m + C} * A \quad \text{[jednačina 2]}$$

$P_{pt}$  i  $P_{at}$  predstavljaju permeabilnosti lekovite supstance pasivnim i aktivnim transportom,  $C$  je koncentracija lekovite supstance u lumenu,  $A$  je površina,  $K_m$  je Michaelis–Menten-ova konstanta, a  $V_{max}$  je maksimalna brzina aktivnog transporta. Permeabilnost zavisi od fizičko-hemijskih osobina lekovite supstance, kao i od uslova koji vladaju u GIT-u. U kojoj meri će varijacije u sastavu mukoze uticati na vrednost  $P_{eff}$  zavisi i od toga koji transportni mehanizmi su uključeni u proces apsorpcije lekovite supstance.

Permeabilnost lekovite supstance se može proceniti na osnovu: 1) farmakokinetičkih podataka dobijenih ispitivanjima u ljudi; 2) rezultata studija intestinalne perfuzije u ljudi i životinja; 3) rezultata ispitivanja permeabilnosti na *in vitro* ćelijskim kulturama ili veštačkim membranama i 4) fizičko-hemijskih osobina lekovite supstance. Kod procene permeabilnosti lekovite supstance se preporučuje da se odabrana metoda za ispitivanje permeabilnosti validira uključivanjem referentnog standarda tj. lekovite supstance poznate permeabilnosti (17, 18).

U literaturi je opisana dobra korelacija između podataka o efektivnoj permeabilnosti ( $P_{eff}$ ) određenoj *in vivo* kod ljudi i podataka o frakciji apsorbovane doze ( $F_a$ ) za veliki broj strukturno različitih lekovitih supstanci (19). Generalno, ukoliko je permeabilnost lekovite supstance niska može se, uz neke izuzetke, očekivati i niska apsorpcija i bioraspoloživost. S obzirom na vezu između permeabilnosti i apsorpcije lekovite supstance, faktori koji utiču na permeabilnost (lipofilnost, rastvorljivost, veličina molekula) se odražavaju i na apsorpciju lekovite supstance (4). Stoga se u slučaju lipofilnih i nejonizovanih supstanci, kod kojih je pasivna, transcelularna difuzija primarni mehanizam apsorpcije, može očekivati veća permeabilnost, a time i veća apsorpcija. Takođe, fiziološki faktori kao što je zastupljenost transportnih proteina u različitim delovima GIT-a mogu značajno da utiču na permeabilnost i njen efekat na apsorpciju lekovite supstance. Dakle, permeabilnost se smatra jednim od najvažnijih faktora od kojih zavisi apsorpcija lekovite supstance, te se eksperimentalni i računarski modeli koji se koriste za procenu permeabilnosti mogu koristiti i za procenu, odnosno predviđanje stepena apsorpcije lekovite supstance.

### 1.1.2. Fizičko-hemijski faktori koji utiču na apsorpciju lekovite supstance

Značaj fizičko-hemijskih osobina za apsorpciju lekovite supstance je prepoznat kroz “pravilo petice“, koje su uspostavili Lipinski i saradnici (20). Ova istraživačka grupa je analizirala 2245 supstanci koje su bile u fazi razmatranja ili su već ušle u fazu II kliničkih ispitivanja. Rezultati su ukazali na to da je dobra apsorpcija nakon oralne primene verovatnija kod lekovitih supstanci koje imaju manje od 5 donora vodonične veze (definisanih kao NH ili OH grupe), zatim manje od 10 akceptora vodonične veze (definisanih kao atomi kiseonika ili azota, uključujući i one koji su deo donora vodonične veze), te čija je molekulska masa manja od 500 Da i izračunati parametar lipofilnosti  $clogP$  manji od 5 (20).

Polarna površina molekula (engl. *Polar surface area*, PSA) je fizičko-hemijski faktor, koji se često koristi za predviđanje apsorpcije lekovite supstance. PSA se definiše kao površina polarnih atoma u molekulu, prvenstveno kiseonika i azota, kao i vodonikovih atoma koji su za njih vezani. Neki istraživači su u PSA uključili i atome fosfora i sumpora i za njih vezane vodonikove atome (21). Palm i saradnici su pokazali dobru korelaciju između PSA lekovitih supstanci i njihove permeabilnosti određene na dva široko korištena *in vitro* modela (Caco-2 monosloj i segmenti intestinuma pacova). Kao model supstance su koristili seriju homologa antagonista  $\beta$ -adrenoreceptora. Dobijene su odlične korelacije između PSA ovih molekula i njihove permeabilnosti na Caco-2 ćelijama i ileumu pacova, pri čemu su vrednosti koeficijenta determinacije ( $R^2$ ) bile 0,99 i 0,92, redom (22). Palm i saradnici su takođe utvrdili odličnu sigmoidalnu korelaciju ( $R^2$ : 0,94) između PSA i apsorbovane frakcije lekovite supstance kod čoveka ( $Fa$ ) za 20 lekovitih supstanci koje su imale širok opseg  $Fa$  vrednosti (0,3 – 100%) i različite fizičko-hemijske osobine. Lekovite supstance su predominantno absorbovane pasivnom difuzijom (23). Ova istraživačka grupa je na osnovu regresione analize zaključila da će molekule leka sa PSA vrednostima većim od  $140 \text{ \AA}^2$  pokazati nisku apsorpciju nakon oralne primene ( $Fa < 10\%$ ), a da se u slučaju lekovitih supstanci sa PSA vrednostima manjim od  $60 \text{ \AA}^2$  može očekivati potpuna apsorpcija ( $Fa > 90\%$ ). Do sličnih zaključaka su došli Kelder i saradnici (24), koji su izračunali PSA za 776 lekovitih supstanci sa dejstvom na CNS i 1590 lekovitih supstanci bez dejstva na CNS, koje su stigle do faze II kliničkih ispitivanja. Pokazano je da lekovite supstance koje se primenjuju oralno i apsorbuju se pasivnom difuzijom, transcelularnim putem imaju PSA vrednosti manje od  $120 \text{ \AA}^2$ .

#### *Konstanta disocijacije*

Većina lekovitih supstanci su slabe kiseline ili baze. Step en jonizacije nakon oralne primene ovih lekovitih supstanci zavisi od njihovih pKa vrednosti i pH gradijenta u gastrointestinalnom traktu. Međusobni odnos ova dva parametra ima veliki uticaj na rastvorljivost i permeabilnost lekovite supstance, a samim tim i na brzinu i obim njene apsorpcije. Jedan od najstarijih koncepta kojima se objašnjava apsorpcija lekovite supstance nakon oralne primene je teorija pH-zavisne raspodele (25). Prema ovoj teoriji, apsorpcija lekovite supstance iz gastrointestinalnog trakta se uglavnom odvija procesom pasivne difuzije nejonizovanog oblika molekula kroz lipofilnu intestinalnu membranu. Frakcija nejonizovanog oblika kisele ili bazne lekovite supstance se može izračunati pomoću Henderson-Hasselbalch-ove jednačine (26), čiji je oblik za monokisele supstance:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log_{10} \left( \frac{\text{Koncentracija jonizovanog oblika}}{\text{Koncentracija nejonizovanog oblika}} \right) \quad \text{[jednačina 3]}$$

a za monobazne supstance:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log_{10} \left( \frac{\text{Koncentracija nejonizovanog oblika}}{\text{Koncentracija jonizovanog oblika}} \right) \quad \text{[jednačina 4]}$$

Dakle, apsorpcija slabe baze će biti bolja u tankom crevu u odnosu na želudac, s obzirom na to da je pH vrednost viša u tankom crevu, te će veći procenat nejonizovanog oblika biti dostupan za apsorpciju. Nasuprot tome, veća apsorpcija slabo kisele lekovite supstance bi se mogla očekivati u želucu (26). Međutim, tanko crevo je glavno mesto za apsorpciju i slabih kiselina i baza zbog veće površine dostupne za apsorpciju u poređenju sa želucom i kolonom (4).

Pored uticaja na permeabilnost lekovite supstance, pKa vrednost takođe utiče i na njenu rastvorljivost. Dobro je poznato da pKa i osnovna (engl. *intrinsic*) rastvorljivost lekovite supstance (rastvorljivost nejonizovanog oblika) imaju ključnu ulogu u određivanju njene rastvorljivosti u medijumima različitih pH vrednosti (27, 28). Bitno je napomenuti da niska pKa vrednost kiselih lekovitih supstanci ili visoka pKa vrednost baznih supstanci ne garantuju visoku rastvorljivost u celom opsegu pH vrednosti GIT-a, osim ukoliko lekovita supstanca ima visoku osnovnu rastvorljivost (29).

## *Obrazovanje soli*

Obrazovanjem soli se menja sila privlačnosti između jonizovanog oblika lekovite supstance, koja je slaba kiselina ili baza, i suprotno naelektrisanih jona čime se menja potencijalna energija čvrstog stanja. Ovo je najčešće povezano sa promenom pH vrednosti u difuznom sloju na površini čvrste faze koja se rastvara, čime se značajno povećava rastvorljivost lekovite supstance u tom sloju. Generalno, ove promene mogu dovesti do značajnog povećanja brzine rastvaranja lekovite supstance i njene prividne rastvorljivosti. Nelson (30) je prvi opisao ovaj fenomen pokazavši da soli teofilina sa visokim pH vrednostima u difuznom sloju oko čvrstih čestica imaju veću brzinu rastvaranja u odnosu na one sa nižim pH vrednostima difuznog sloja. Ovi rezultati su bili povod za velikih broj kasnijih studija koje su pokazale uticaj obrazovanja soli na brzinu rastvaranja lekovite supstance (28, 29, 31-33).

## *Kristalna struktura*

Različiti polimorfni oblici lekovite supstance su hemijski identični. Međutim, usled razlike u pakovanju molekula unutar kristalne rešetke, polimorfni oblici imaju različite fizičko-hemijske osobine kao što su molekulaska gustina, temperatura topljenja, higroskopnost i entalpija fuzije (29, 33). Uprkos ovim razlikama, različiti polimorfni oblici često imaju sličnu rastvorljivost. Pudipeddi i Serajuddin su ispitivali razlike u rastvorljivosti između različitih polimorfnih oblika lekovitih supstanci i utvrdili su da ova razlika nije bila veća od dva puta (34). Kod visoko rastvorljivih lekovitih supstanci se ne očekuje da će ova razlika u rastvorljivosti između različitih polimorfnih oblika značajno uticati na apsorpciju lekovite supstance (35). Međutim, u slučaju nisko rastvorljivih lekovitih supstanci i malo povećanje rastvorljivosti može značajno povećati apsorpciju, te se vrše ispitivanja u cilju otkrivanja polimorfnog oblika koji ima visoku rastvorljivost (36). Polimorfizam može značajno da utiče na fizičku i hemijsku stabilnost lekovite supstance (neki od primera su karbamazepin (37), indometacin (38), furosemid (39) i enalapril maleat (40)). Postoje, takođe, značajne razlike između kristalnih polimorfnih oblika i amorfne oblika lekovite supstance. Generalno, amorfni oblici imaju značajno veću rastvorljivost i brzinu rastvaranja u poređenju sa kristalnim oblicima što može značajno da utiče na brzinu i obim apsorpcije lekovite supstance. Međutim, amorfni oblici su uglavnom manje hemijski stabilni zbog odsustva uređene trodimenzionalne strukture kristalne rešetke, veće slobodne zapremine i veće pokretljivosti molekula (41).

Solvatisani oblici lekovite supstance, poznati i kao pseudopolimorfni oblici, su kristalni oblici koji unutar kristalne rešetke sadrže molekule rastvarača. Kada je inkorporirani rastvarač voda, solvatisani oblik se naziva hidrat. Različiti solvatisani oblici lekovite supstance mogu da imaju različitu rastvorljivost i brzinu rastvaranja. Ovo posebno važi za hidrate, koji mogu da imaju veću (uglavnom) ili manju brzinu rastvaranja u odnosu na odgovarajući anhidrovani oblik (36). Tako se, na primer, anhidrovani oblik teofilina brže rastvara u poređenju sa hidratnim oblikom (42), dok se eritromicin-dihidrat značajno brže rastvara u odnosu na monohidratni ili anhidrovani oblik (43).

### **1.1.3. Fiziološki faktori**

Brzina i obim apsorpcije lekovite supstance nakon oralne primene mogu značajno varirati usled variranja fizioloških faktora u gastrointestinalnom traktu. Neki od najznačajnijih fizioloških faktora koje je potrebno uzeti u obzir prilikom razmatranja procesa apsorpcije su osobine i zapremina intraluminalne tečnosti, prisustvo hrane u lumenu GIT-a, brzina pražnjenja želuca, vreme prolaska leka kroz različite segmente GIT-a i površina intestinalne membrane (44).

## *Osobine i zapremina intraluminalne tečnosti*

### *Sastav*

Gastrointestinalna tečnost je kompleksna, dinamična smeša različitih komponenti. Želudac je prvi organ u kojem se ostvaruje duži i intenzivan kontakt između oralno primenjenog farmaceutskog oblika leka i gastrointestinalne tečnosti. Sadržaj u želucu čine progutana pljuvačka, komponente želudačne sekrecije, komponente hrane i tečnost koja u želudac dospeva refluksom iz duodenuma. Na brzinu rastvaranja lekovite supstance iz farmaceutskog oblika leka može da utiče prisustvo žučnih soli, lipaza i pepsina. Pored toga, pepsin može uticati na stabilnost proteina i peptida, dok lipaza može uticati na oslobađanje lekovite supstance iz lipidnih nosača (45). Žučne soli se mogu kombinovati sa lipidima i formirati mešane micelle što može dovesti do povećanja rastvorljivosti nekih lekovitih supstanci. One mogu da dovedu i do smanjenja površinskog napona što omogućava bolje kvašenje (46). Kalantzi i saradnici (47) su utvrdili da je središnja vrednost (medijana) koncentracije pepsina u stanju na gladno (preprandijalno) u rasponu od 0,11 do 0,22 mg/mL, dok su drugi istraživači pronašli da su ove vrednosti između 0,1 i 1,3 mg/mL (48, 49). Koncentracija pepsina nakon obroka (postprandijalno) je obično viša i pokazano je da varira od 0,26 do 1,72 mg/mL (47, 49). Gastrična lipaza najverovatnije nema značajnu ulogu u preprandijalnom stanju s obzirom na to što je aktivna u opsegu pH vrednosti 3-6 (50). Njena aktivnost, izmerena u želucu u postprandijalnom stanju, je bila između 11,4 i 43,9 U/mL (51). Koncentracija žučnih soli u želucu je nešto viša u preprandijalnom stanju (od 0,08 do 0,275 mM) (50, 52) u odnosu na postprandijalno stanje (0,06 mM) (53).

Tečnost u gornjem delu tankog creva se sastoji uglavnom od himusa iz želuca, kao i proizvoda sekrecije jetre, pankreasa i zida tankog creva. Sastav tečnosti varira zavisno od segmenta tankog creva, stepena mešanja, apsorpcije tečnosti kroz zid creva i prelaska u donje delove intestinalnog trakta. Sekrecija pankreasa uključuje bikarbonate, proteaze (tripsin i himotripsin), amilaze i lipaze (54). Jetra sekretuje žuč, koja sadrži žučne soli, fosfolipide, bikarbonate, holesterol i žučne pigmente. Zid tankog creva sekretuje jone kao što su bikarbonati, natrijum, hlorid, kao i vodu. Bikarbonati se sekretuju da bi neutralisali želudačnu sekreciju u gastrointestinalnom lumenu i zaštitili epitelne ćelije od potencijalnog oštećenja kiselinom (55).

S obzirom na to da hrana podstiče sekreciju različitih komponenata u tankom crevu, sastav postprandijalne intestinalne tečnosti može značajno da se razlikuje od preprandijalne što delimično može da bude uzrok promene u bioraspoloživosti lekovite supstance kada se lek uzima sa hranom. Pokazano je da primena nekih lipofilnih lekovitih supstanci zajedno sa hranom može da dovede do povećane bioraspoloživosti u poređenju sa primenom leka na gladno. Sunesen i saradnici (56) su pokazali da se bioraspoloživost slabo rastvorljivog danazola povećava tri puta kada se ova lekovita supstanca uzima sa obrokom sa visokim sadržajem lipida u poređenju sa primenom na gladno. Međutim, u nekim slučajevima, bioraspoloživost leka nakon oralne primene može biti smanjena usled postprandijalnih promena uslova u GIT-u (pH vrednost, motilitet, vreme prolaska kroz različite segmente GIT-a i viskozitet), koje mogu usporiti oslobađanje lekovite supstance iz farmaceutskog oblika, te dovesti do smanjenja njene difuzije i brzine rastvaranja. Osim toga, do smanjenja bioraspoloživosti lekovite supstance u prisustvu hrane može doći i usled stvaranja kompleksa lekovite supstance sa komponentama hrane (57, 58).

Povećana bioraspoloživost nekih lekovitih supstanci u postprandijalnom stanju se može pripisati povećanom kapacitetu solubilizacije intestinalne tečnosti usled sekrecije pankreasa i žuči i prisustva egzogenih lipida (59). Na primer, trigliceridi iz hrane se u duodenumu hidrolizuju u slobodne masne kiseline i monogliceride uglavnom pod dejstvom lipaza pankreasa, a zatim se slobodne masne kiseline kombinuju sa žučnim solima i formiraju mešane micelle, koje se mogu transportovati do intestinalne membrane. U literaturi postoje brojni primeri poboljšane rastvorljivosti i brzine rastvaranja lekovitih supstanci usled prisustva ovih mešanih micela (60-62). Koncentracija proizvoda lipolize, žučnih soli i fosfolipida u gornjem delu tankog creva značajno varira u toku vremena i između pojedinaca (47, 63). Koncentracije proizvoda lipolize u gornjem delu tankog

creva variraju od 0 do 1,8 mg/mL u preprandijalnom stanju i od 0,5 do 100 mg/mL u postprandijalnom stanju (51, 63), fosfolipida od 0,03 do 0,6 mM u preprandijalnom (63, 64) i od 0,8 do 3 mM u postprandijalnom stanju (63, 65), a žučnih soli od 0,6 do 17 mM u preprandijalnom (63, 66) i od 1,6 do 40 mM u postprandijalnom stanju (67, 68).

#### *pH vrednost*

pH vrednost tečnosti u različitim delovima GIT-a značajno utiče na brzinu rastvaranja lekovite supstance iz farmaceutskog oblika leka, kao i na njenu permeabilnost (69, 70). Rastvorljivost slabih elektrolita u velikoj meri zavisi od pH vrednosti sredine. Kada je pH vrednost takva da je lekovita supstanca u jonizovanom obliku, ona se ponaša kao jak elektrolit i rastvorljivost je obično visoka u poređenju sa nejonizovanim oblikom (71). Dakle, pH vrednost ima veliki uticaj na brzinu rastvaranja, naročito onih lekovitih supstanci čije su pKa vrednosti unutar fiziološkog opsega pH. pH vrednost gastrointestinalnih tečnosti varira duž GIT-a i zavisi od velikog broja faktora kao što su unos hrane (zapremina i sadržaj obroka) i gastrointestinalna sekrecija.

U želucu je u preprandijalnom stanju pH vrednost uglavnom niska kao posledica lučenja hlorovodonične kiseline od strane parijetalnih ćelija; središnja vrednost (medijana) izmerene pH je između 1,5 i 1,9 (72-76). Unos hrane može značajno da promeni uslove koji vladaju u želucu. Inicijalna postprandijalna pH vrednost u velikoj meri zavisi od zapremine i sastava unetog obroka (47, 76, 77). Hrana dovodi do blagog pada pH vrednosti tokom procesa varenja; središnja vrednost (medijana) izmerene pH u različitim studijama je bila 5,2 i 5,4 tokom prva tri sata nakon obroka (47, 76). Vreme reacidifikacije zavisi od puferskog kapaciteta obroka, kao i od brzine pražnjenja želuca (47, 76, 78).

#### *Puferski kapacitet*

Puferski kapacitet gastrointestinalne tečnosti može da utiče na brzinu rastvaranja lekovite supstance iz farmaceutskog oblika (79). Što je veći puferski kapacitet, manje će biti promene pH vrednosti na kontaktnoj površini lek-tečnost. Puferski kapacitet gastrointestinalne tečnosti zavisi od njene pH vrednosti, kao i pKa vrednosti i koncentracije komponenti pufera.

Prosečan puferski kapacitet preprandijalnog želudačnog sadržaja je  $14,3 \pm 9,5$  mmol/L/ $\Delta$ pH (74). Očekuje se da će nakon obroka puferski kapacitet želudačne tečnosti inicijalno biti približan puferskom kapacitetu obroka (47).

Središnja vrednost (medijana) eksperimentalno određenih vrednosti puferskog kapaciteta sadržaja gornjeg dela tankog creva u preprandijalnom stanju je bila između 5,6 i 11,5 mmol/L/ $\Delta$ pH (47). Prisustvo hrane takođe dovodi do značajne promene puferskog kapaciteta u gornjem delu tankog creva, koji je bio u proseku više od dvostruko veći u odnosu na preprandijalno stanje (47, 63, 80, 81).

#### *Viskozitet*

Pokazano je da viskozitet medijuma može značajno uticati na oslobađanje i brzinu rastvaranja lekovite supstance iz farmaceutskog oblika (82-84). Prisustvo hrane dovodi do povećanja viskoziteta želudačnog sadržaja u stepenu koji zavisi od sastava i veličine obroka. Viskozitet se vraća na preprandijalnu vrednost (od 1,7 do 9,3 mPa\*s) usled normalne želudačne sekrecije (85-87). Povećan viskozitet usporava pražnjenje želuca i produžava vreme prolaska sadržaja kroz GIT (86, 88).

#### *Površinski napon*

Površinski napon medijuma može da utiče na kvašenje, a time i na brzinu rastvaranja lekovite supstance iz farmaceutskog oblika. Veći površinski napon olakšava kvašenje (89). Površinski napon tečnosti u želucu u preprandijalnom stanju se kreće od 41 do 46 mN/m, dok su u postprandijalnom stanju ove vrednosti u intervalu od 30 do 31 mN/m (47). U gornjem delu tankog creva, vrednost

površinskog napona se kreće od 28 do 46 mN/m u preprandijalnom stanju i od 27 do 37 mN/m u postprandijalnom stanju (63, 65).

### *Osmolalnost*

Osmolalnost medijuma može da utiče na oslobađanje lekovite supstance iz farmaceutskog oblika (90). Utvrđeno je da se osmolalnost želudačne tečnosti u preprandijalnom stanju kreće od 29 do 276 mOsm/kg (91, 92). Kalantzi i saradnici su (47) pokazali da je sadržaj želuca u preprandijalnom stanju hipoosmotičan i varira od 98 mOsm/kg do 140 mOsm/kg. Pola sata posle obroka središnja vrednost (medijana) osmolalnosti tečnosti u želucu je bila 559 mOsm/kg, da bi se nakon 210 minuta posle obroka ova vrednost spustila na 217 mOsm/kg. U gornjem delu tankog creva, osmolalnost tečnosti se kreće u interval od 124 do 278 mOsm/kg u preprandijalnom stanju (63, 72) i od 250 do 367 mOsm/kg u postprandijalnom stanju (63).

### *Zapremina*

Zapremina želučanog sadržaja je određena zapreminom tečnosti i hrane koja se unosi, kao i zapreminom oralne i gastrične sekrecije umanjenom za zapreminu tečnosti koja pređe u tanko crevo. U kojoj će meri uneta tečnost i hrana da utiču na zapreminu želučanog sadržaja zavisiće pre svega od kalorijske vrednosti sastojaka hrane. Pokazano je da unos visoko kaloričnog (800-1000 kcal), standardnog doručka sa visokim sadržajem masti, kao što preporučuju EMA i FDA u studijama uticaja hrane na bioraspodivnost oralno primenjenih lekova, dovodi do povećanja zapremine gastrične tečnosti od 4-65 ml u preprandijalnom stanju do 500-628 ml neposredno nakon unosa obroka (77, 93). Ova zapremina je suma zapremine obroka, rezidualnog sadržaja i oralne i gastrične sekrecije.

Zapremina tečnosti u tankom crevu zavisi od količine tečnosti koja se isprazni iz želuca, apsorpcije tečnosti kroz zid tankog creva i vremena prolaska kroz tanko crevo. U preprandijalnom stanju zapremina varira od 30 do 420 ml (94), sa prosečnim vrednostima koje su se spuštale i do 100 ml u različitim studijama (95-97). Zapremina u postprandijalnom stanju varira od 18 do 660 ml i zavisi u velikoj meri od količine i sastava obroka (95, 97).

Schiller i saradnici (94) su koristili tehniku magnetne rezonance (engl. *Magnetic resonance imaging*, MRI) da bi ispitali kako je tečnost distribuirana duž lumena GIT-a. Utvrdili su da se slobodna voda nalazi u obliku jasno ograničenih "džepova". U preprandijalnom stanju u tankom crevu je srednji broj ovih "džepova" bio 4, dok je središnja vrednost zapremine tečnosti bila 12 ml po "džepu". U postprandijalnom stanju je srednji broj "džepova" bio 6, a središnja vrednost zapremine tečnosti 4 ml. Osim toga, zapremina slobodne tečnosti je bila manja u postprandijalnom stanju u odnosu na preprandijalno stanje (94).

### *Brzina pražnjenja želuca*

Brzina pražnjenja želuca se definiše kao brzina kojim se tečni i čvrsti sadržaj prazni iz želuca u tanko crevo i od nje zavisi vreme zadržavanja leka u želucu, kao i brzina kojom lek prelazi u tanko crevo. S obzirom na to da se većina lekovitih supstanci primarno apsorbuje u tankom crevu, brzina i stepen kojom se lekovita supstanca pojavljuje u ovom segmentu direktno utiče na njenu apsorpciju, a time i na početak željenog terapijskog efekta. Brzina pražnjenja želuca može da bude ograničavajući korak u apsorpciji supstanci iz grupe 1 Biofarmaceutskog sistema klasifikacije (engl. *Biopharmaceutical classification system*, BCS), koje se brzo rastvaraju iz farmaceutskih oblika sa trenutnim oslobađanjem (98).

Brzina pražnjenja želuca zavisi od karakteristika lekovite supstance (99), vrste i sastava farmaceutskog oblika leka, prisustva hrane, veličine i sastava obroka, (100), pozicije tela (101) i zdravstvenog stanja pojedinca (102). Kwiatek i saradnici (103) su utvrdili da se poluvreme pražnjenja želuca skraćuje sa porastom zapremine tečnih komponenti obroka i produžava sa porastom kalorijske vrednosti obroka. Poluvreme pražnjenja želuca posle tipičnog obroka varira od 70 do 130 minuta (100).

### *Vreme prolaska kroz tanko crevo*

Vreme prolaska/zadržavanja leka u intestinalnom traktu u velikoj meri utiče na brzinu rastvaranja lekovite supstance iz farmaceutskog oblika i njenu apsorpciju, a zavisi pre svega od gastrointestinalnog motiliteta. Weitschies i saradnici (104) su sprovedli studiju u kojoj su primenom tehnike magnetnog obeležavanja (engl. *Magnetic marker monitoring*, MMM) pratili kretanje neraspadljive kapsule u GIT-u ispitanika u više različitih intervala. Utvrdili su da je varijabilnost u vremenu zadržavanja kapsule u različitim segmentima GIT-a velika čak i kod istog pojedinca (104).

U literaturi se najčešće navodi da je vreme prolaska leka kroz tanko crevo od 3 do 4 h (44). McConelli i saradnici (105) su utvrdili da kod pojedinca, kojem su date pelete obložene etilcelulozom dijametra od 1 do 1,4 mm u osam odvojenih intervala, vremena prolaska variraju od 0,5 do 5,4 h sa srednjom vrednošću od 3,2 h. Oni su, na osnovu pregleda literature, utvrdili da uzimanje hrane nije povezano sa promenama u vremenu prolaska farmaceutskog oblika leka kroz tanko crevo. U meta analizi koju su sprovedli Davis i saradnici nisu pronađene značajne razlike u vremenu prolaska kroz tanko crevo između tableta, peleta i tečnih farmaceutskih oblika (106).

Vreme prolaska kroz tanko crevo je od posebnog značaja za farmaceutske oblike lekovitih supstanci koje se ne apsorbuju u potpunosti, jer će promena u vremenu kontakta sa apsorptivnom površinom rezultirati promenom u obimu apsorpcije ovih lekovitih supstanci. Generalno, produženo vreme prolaska kroz tanko crevo može dovesti do povećanja u apsorpciji lekovitih supstanci koje se inače slabo i nepotpuno apsorbuju. Međutim, apsorpcija može da bude i smanjena u slučaju usporavanja prolaska kroz tanko crevo usled smanjenja agitacije nepokretnog sloja vode zbog inhibicije motiliteta glatke muskulature. Do ovakve situacije može da dovede primena nekih lekova kao što su npr. antiholinergici (107).

### *Površina intestinalne membrane*

Brzina i obim apsorpcije lekovite supstance zavisi od površine koja je dostupna za apsorpciju. Generalno, brzina apsorpcije će biti veća što je veća površina dostupna za apsorpciju. Lekovite supstance se retko apsorbuju u želucu zbog male površine i kratkog vremena zadržavanja farmaceutskog oblika (108). Tanko crevo predstavlja primarno mesto apsorpcije najvećeg broja lekovitih supstanci zbog velike površine dostupne za apsorpciju i dužeg vremena zadržavanja. Mukozna površina tankog creva je naborana i prekrivena resicama, a svaka resica je prekrivena mikroresicama. Naborana mukoza zajedno sa resicama i mikroresicama povećava površinu tankog creva približno 600 puta u odnosu na ravnu cev iste dužine i dijametra (109). Ove anatomske karakteristike značajno povećavaju površinu duodenuma i gornjeg dela jejunuma u odnosu na ileum. Jejunum ima najveću dostupnu površinu (107).

Dok je apsolutna površina tankog creva prilično velika, geometrijska površina (izračunata samo na osnovu dužine i dijametra creva) može biti bolji pokazatelj površine koja je dostupna za apsorpciju, jer daje bolju procenu površine nepokretnog sloja vode, koji predstavlja barijeru za apsorpciju lekovite supstance (44).

#### **1.1.4. Farmaceutsko-tehnološki faktori**

Izbor farmaceutskog oblika leka i ekscipijenasu može značajno da utiče na profil apsorpcije lekovite supstance *in vivo*, u organizmu. Izborom odgovarajućih ekscipijenasu, farmaceutski oblik može da bude formulisan tako da se poveća ili smanji brzina rastvaranja lekovite supstance u odnosu na farmaceutski oblik koji ne sadrži ove ekscipijense (110), što direktno utiče na koncentraciju lekovite supstance u lumenu GIT-a i njenu apsorpciju. Odgovarajućim izborom ekscipijenasu se može, do određene mere, uticati i na fiziološke uslove na mestu apsorpcije, a time i na biofarmaceutske faktore značajne za proces apsorpcije (111).

## *Ekscijijensi*

Ekscijijensi, koji se nalaze u lekovitom preparatu, mogu različitim mehanizmima da utiču na bioraspoloživost inkorporirane lekovite supstance (112). Oni mogu da hemijski reaguju sa lekovitom supstancom, smanjujući na taj način količinu supstance koja je raspoloživa za apsorpciju. Na primer, u studijama kompatibilnosti je pokazano da laktoza može da stupi u interakciju sa aciklovirom (113), amlodipinom (114), metforminom (115) i drugim aminima, dok je za polivinilpirolidon pokazana interakcija sa oksprenololom (116) i sulfatiazolom (117). Sa biofarmaceutskog aspekta, funkcionalni ekscijijensi mogu da ispolje veliki broj dobro poznatih efekata uključujući povećanje kvašenja, brzine rastvaranja lekovite supstance iz farmaceutskog oblika i rastvorljivosti lekovite supstance (112). Rastvorljivost lekovite supstance zavisi od njenih fizičko-hemijskih osobina uključujući njen kristalni oblik, a odgovarajući polimorfni oblik, ili amorfno stanje može biti stabilizovano dodatkom određenih ekscijijenasa (41, 118). Uključivanjem odgovarajućih ekscijijenasa (npr. mezoporozni silicijum dioksid) u formulaciju je moguće uticati i na efektivnu površinu dostupnu za rastvaranje, a time i na brzinu rastvaranja lekovite supstance iz farmaceutskog oblika (119, 120). Ekscijijensi mogu da poboljšaju rastvorljivost i brzinu rastvaranja lekovite supstance i drugim mehanizmima kao što su solubilizacija i supersaturacija (112).

Prisustvo ekscijijenasa u formulaciji može da utiče i na fiziološke uslove i procese uključene u apsorpciju lekovite supstance. Osmotski aktivni ekscijijensi mogu da skrate vreme prolaska leka kroz GIT tako što se koriste u koncentracijama koje dovode do povećanja volumena gastrointestinalne tečnosti do nivoa koji stimuliše GI motilitet (121). Na primer, sorbitol i manitol (u dozama od 2,2 do 2,5 g) su dva šećerna alkohola sa niskom permeabilnošću koji značajno smanjuju bioraspoloživost lekovitih supstanci iz grupe 3 Biofarmaceutskog sistema klasifikacije, ranitidina i cimetidina, za 25 i 31%, redom (122, 123). Nasuprot tome, ekscijijensi koji imaju mukoadhezivne osobine mogu da produže vreme zadržavanja lekovite supstance kroz GIT (124). Ekscijijensi mogu da reaguju sa metaboličkim enzimima i drugim komponentama u GIT-u, što može da dovede do promene u profilu apsorpcije lekovite supstance (112, 125). Posebnu grupu čine ekscijijensi koji direktno utiču na proces apsorpcije lekovite supstance. To su tzv. modifikatori apsorpcije ili inhenseri penetracije, koji deluju tako što menjaju integritet intestinalne epitelne membrane ili dovode do otvaranja uskih međučelijskih veza, čineći na taj način membranu propustljivijom ili pak povećavaju aktivni transport i inhibišu efluks transportere (125, 126).

Uticao ekscijijenasa na bioraspoloživost lekovite supstance se najbolje uočava u *in vivo* studijama bioekvivalencije kod čoveka. Informacije o efektu ekscijijenasa su posebno značajne u kontekstu komparativnih studija: formulacija A se poredi sa formulacijom B koja sadrži različite ekscijijense. Takve studije relativne bioekvivalencije nisu značajne samo u kontekstu razvoja generičkih lekovitih preparata, već i u slučaju promena u postojećoj formulaciji. Razumevanje uticaja ekscijijenasa na farmakokinetički profil lekovite supstance je posebno interesantno sa aspekta razmatranja mogućnosti izostavljanja *in vivo* studija bioekvivalencije (*biowaiver*) za farmaceutske oblike sa trenutnim oslobađanjem (112).

### **1.1.5. Uticaj hrane**

Uticaj hrane je prepoznat kao jedan od velikih izazova za obezbeđenje adekvatne apsorpcije lekovite supstance nakon oralne primene lekovitog preparata. Najveći broj novootkrivenih lekovitih supstanci pokazuje nisku rastvorljivost i njihova bioraspoloživost često zavisi od uslova u lumenu GIT-a (127, 128). Ovo se posebno odnosi na nove antitumorske lekove, koji često pokazuju značajne promene u bioraspoloživosti posle primene sa hranom, jer su mnogi od njih nisko rastvorljivi i primenjuju se u visokim dozama (129). Istovremeno uzimanje lekova i hrane može da dovede do povećanja apsorpcije (pozitivan efekat hrane, povećanje obima apsorpcije za više od 25%), smanjenja (negativan efekat hrane, smanjenje obima apsorpcije za više od 20%), odlaganja ili pak apsorpcija može biti nepromenjena (130).



Kao što je već opisano u poglavlju 1.1.3, prisustvo hrane može dovesti do promene fizioloških uslova u GIT-u (Slika 3) što može da dovede do promene u apsorpciji lekovite supstance. Ove interakcije lekova i hrane su nespecifične, što znači da su primenjive na bilo koji farmaceutski oblik leka. Međutim, njihov značaj zavisi od osobina lekovite supstance i farmaceutskog oblika. Osim toga, hrana se sastoji od smeše različitih komponenti visoke i niske molekulske mase i bilo koja od ovih komponenti može da reaguje sa lekovitom supstancom stvarajući komplekse, pri čemu se apsorpcija ovih kompleksa značajno razlikuje od apsorpcije slobodne lekovite supstance. Ove specifične interakcije između lekova i hrane mogu značajno da utiču na apsorpciju (127).

Generalno, ako je rastvorljivost ograničavajući faktor za apsorpciju lekovite supstance nakon oralne primene, dostupnost i sastav luminalne tečnosti će biti od velikog značaja. Zapremina tečnosti dostupna za rastvaranje lekovite supstance može da odredi njenu luminalnu koncentraciju tj. količinu nisko rastvorljive lekovite supstance koja se može rastvoriti u određenim delovima GIT-a. Prisustvo koncentracionog gradijenta između intestinalnog lumena i krvi omogućava nesmetano odvijanje pasivnog transporta. Osim toga, u slučaju nisko rastvorljivih lekovitih supstanci sa nelinearnom farmakokinetikom, koje se apsorbuju putem transportera ili se pak metabolišu putem određenih enzima u GIT-u, male promene u luminalnoj koncentraciji mogu imati dramatične efekte zbog mogućnosti saturacije transportera i enzima. Pored uticaja na luminalnu koncentraciju lekovite supstance, zapremina želudačnog sadržaja ima značajan uticaj na vreme zadržavanja preparata i njegov prelazak u tanko crevo. Promene u zapremini luminalne tečnosti, posebno u želucu i tankom crevu, mogu da imaju značajnu ulogu u ispoljavanju efekta hrane. Čak i izolovane promene u zapremini tečnosti i pražnjenju želuca se smatraju faktorima koji mogu dovesti do promene u  $t_{max}$ ,  $C_{max}$  ili do pojave višestrukih pikova, ali ne nužno i do promene u bioraspoloživosti (127). Kao što je već pomenuto, Schiller i saradnici (94) su pokazali da je zapremina tečnosti u tankom crevu smanjena nakon unosa standardnog obroka. Međutim, dobijeni rezultati zavise od toga koja metoda ispitivanja je primenjena. Prilikom snimanja magnetnom rezonancom, koja se najčešće koristi u ove svrhe, samo slobodna voda daje signal jakog intenziteta (131). Međutim, tanko crevo je uglavnom ispunjeno himusom, koji daje slabiji signal. Prema tome, luminalni sadržaj, čiji signal ima intezitet ispod praga kvantifikacije za MRI, nije u potpunosti uzet u obzir što najverovatnije dovodi do toga da su dobijene vrednosti za ukupnu zapreminu tečnosti u tankom crevu manje u odnosu na realnu situaciju. Iako je voda u himusu manje mobilna, jer je vezana ili zarobljena u matriksu hrane, ona još uvek može biti dostupna za rastvaranje lekovite supstance. Ova činjenica se mora imati na umu kada se razmatraju podaci o zapremini tečnosti u GIT-u (127) i ispravan termin bi možda bio "prividna zapremina tečnosti u tankom crevu" (132). Osim toga, treba imati u vidu da je ova prividna zapremina dinamično distribuirana kroz celo tanko crevo i da su apsorpcija i sekrecija vode visoko dinamični procesi. Drugim rečima, slobodna tečnost u lumenu tankog creva ne potiče samo od tečnosti koja se unese, već može biti i rezultat intestinalne sekrecije (127). Zapremina tečnosti u tankom crevu zavisi i od vrste hrane koja se unese. Tako je, na primer, pokazano da nakon primene polučvrstog obroka, koji se sastojao od sutlijaša sa mekinjama, dolazi do momentalnog smanjenja zapremine tečnosti, nakon čega sledi sporo povećanje sadržaja u tankom crevu (97). Porast zapremine tečnosti u tankom crevu je takođe uočen nakon obroka koji su se sastojali od zelene salate i rabarbare (133). Sa druge strane, određene vrste hrane mogu da dovedu do smanjenja zapremine slobodne vode, kao što je pokazano u slučaju integralnog hleba (132). Veliki broj istraživačkih grupa je ispitivao uticaj različitih kaloričnih tečnosti na zapreminu tečnosti u tankom crevu. Interesantno je da prisustvo glukoze smanjuje količinu dostupne tečnosti (97, 134, 135), dok masnoće značajno povećavaju zapreminu tečnosti u tankom crevu (136). Takođe je pokazano da sok od grejpfruta ili napici koji sadrže fruktozu mogu znatno da povećaju zapreminu tečnosti u tankom crevu (134). Dakle, efekat soka grejpfruta na farmakokinetički profil oralno primenjene lekovite supstance ne mora nužno biti posledica specifične interakcije sa transportnim proteinima ili metaboličkim enzimima, već može biti uzrokovan promenama u fiziološkim uslovima u lumenu GIT-a (127).

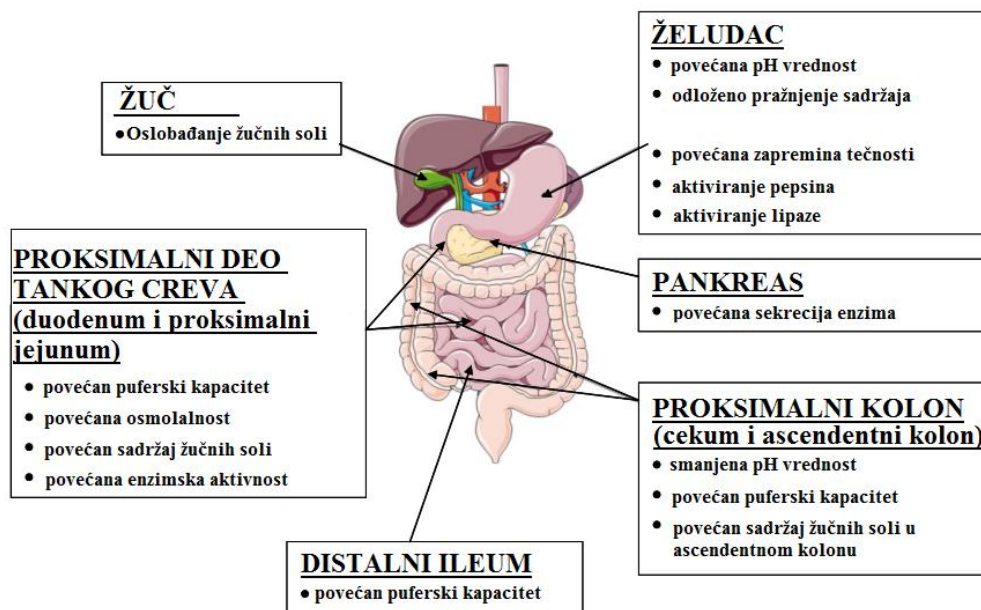
Pored zapremine luminalne tečnosti, na rastvorljivost i brzinu rastvaranja nisko rastvorljive lekovite supstance može značajno da utiče i pH vrednost luminalne tečnosti, koja je, kao što je već objašnjeno, povišena u postprandijalnom stanju. Koenigsnecht i saradnici (137) su pokazali da se rastvorljivost ibuprofena u želucu povećava u postprandijalnom stanju. Ovo je očekivano, jer je ibuprofen slaba kiselina (pKa 4,4), a prisustvo hrane može značajno da povisi pH želuca. Međutim, ovo povećanje rastvorljivosti ne dovodi do povećanja koncentracije ibuprofena u plazmi. Naprotiv, pokazano je da je prisustvo hrane dovelo do smanjenja maksimalne koncentracije lekovite supstance u plazmi (engl. *Peak plasma concentration*,  $C_{max}$ ) i površine ispod krive (PIK<sub>0-24</sub>) koncentracije leka u plazmi u funkciji vremena (engl. *Area under the concentration-time curve*) i produženja vremena potrebnog da se dostigne maksimalna koncentracija lekovite supstance (engl. *Time to reach maximum concentration*,  $t_{max}$ ). Istraživači su zaključili da je razlog negativnog efekta hrane odloženo pražnjenje želuca i prelazak leka u duodenum. U slučaju slabih baza, povišena pH vrednost može da dovede do precipitacije lekovite supstance i posledično smanjene bioraspoloživosti. Međutim, prisustvo hrane podstiče lučenje žuči i povećava enzimsku aktivnost što može da dovede do povećanja rastvorljivosti lekovitih supstanci usled formiranja micela i pozitivnog efekta hrane na apsorpciju (127). Dakle, iako primena hrane dovodi do promene u pH vrednosti luminalne tečnosti, prilikom razmatranja uticaja hrane na apsorpciju lekovite supstance se moraju uzeti u obzir i drugi faktori kao što je pražnjenje želuca i prisustvo žučnih soli.

Pokazano je da u zavisnosti od viskoziteta obroka dolazi do pojave različitih kontrakcija u tankom crevu, ali još nije jasno objašnjeno kako sastav nutrijenata utiče na motilitet tankog creva (127). Kao što je već pomenuto, uzimanje hrane nije povezano sa promenama u vremenu prolaska oralnih farmaceutskih oblika kroz tanko crevo (105). Fadda i saradnici (138) su pokazali da je vreme prolaska kroz tanko crevo radioaktivno obeleženih tableta bilo slično u preprandijalnom (204 min) i postprandijalnom stanju (210 min). Ovo nije iznenađujuće, jer su u uslovima na gladno ispitivani preparati najverovatnije prešli u tanko crevo pod uticajem migracionog motornog kompleksa (engl. *Migrating motor complex*, MMC). Međutim, kada su iste tablete uzete 45 minuta pre standardnog obroka (engl. *pre-feed regimen*), uočena su dva različita obrasca: kod nekih ispitanika je vreme prolaska kroz tanko crevo bilo ubrzano (100 min), dok je kod drugih ispitanika vreme prolaska kroz tanko crevo bilo 185 min. Ova razlika je bila rezultat razlike u vremenu pražnjenja želuca. Naime, po unosu obroka u želudac, intenzivira se motilitet i povećava protok tečnosti u tankom crevu putem složenih povratnih mehanizama. U preprandijalnom stanju srednja vrednost intestinalne brzine protoka tečnosti u svim MMC fazama je 0,73 ml/min u jejunumu i 0,33 ml/min u ileumu. U postprandijalnom stanju se ove brzine protoka značajno povećavaju i to na 3 ml/min u jejunumu i 2,35 ml/min u ileumu, u prvom satu nakon obroka (139). Dakle, tablete koje su nakon uzimanja hrane još uvek bile u želucu nisu bile podvrgnute promenama u motilitetu i protoku tečnosti u tankom crevu. Ove tablete su bile ukolonjene iz želuca pomoću MMC. Međutim, tablete koje su se u vreme uzimanja obroka zatekle u proksimalnom delu tankog creva, su odmah bile podvrgnute pomenutim promenama u protoku i motilitetu i samim tim se ubrzao njihov prolazak kroz tanko crevo. Iako predmet istraživanja Fadda i saradnika (138) nije bila apsorpcija lekovite supstance, oni su na osnovu rezultata opisane studije sugerisali da vreme uzimanja hrane nakon primene oralnog farmaceutskog oblika može da bude kritičan faktor koji će odrediti apsorpciju lekovite supstance, naročito u slučaju lekovitih supstanci sa uskim apsorpcionim prozorom, kao i onih supstanci koje su formulisane kao sistemi sa modifikovanim oslobađanjem.

Promena fizičko-hemijskih karakteristika želudačnog sadržaja u postprandijalnom stanju (povećan puferski kapacitet, osmolalnost i aktivnost pepsina i lipaze) može dovesti do odložene dezintegracije čvrstih farmaceutskih oblika sa trenutnim oslobađanjem (140-142). Kao potencijalna objašnjenja ovog fenomena se, na osnovu *in vitro* podataka, navode: (i) formiranje filma precipitiranih komponenti hrane, uglavnom proteina, oko tablete, koji usporava penetraciju vode i sprečava dezintegraciju tablete (143) i (ii) promena viskoziteta uzrokovana prisustvom hrane (84).

Kada je reč o nespecifičnim interakcijama lekova i hrane usled promene fizioloških uslova u GIT-u, potrebno je posebno pomenuti alkohol, koji se često zloupotrebljava u kombinaciji sa lekovima kao

što su opioidni analgetici (144). Konzumiranje alkohola može da utiče na rastvorljivost i brzinu rastvaranja lekovite supstance iz farmaceutskog oblika i njenu apsorpciju (127, 145, 146).



Slika 3. Promene fizioloških uslova u GIT-u nakon unosa hrane. Podaci za distalni ileum i proksimalni kolon se odnose na stanje 5 min nakon obroka (127).

Kao što je već pomenuto, različite komponente hrane mogu da reaguju sa lekovitim supstancama stvarajući komplekse. U ovom kontekstu poseban značaj ima interakcija između lekovitih supstanci i mleka i mlečnih proizvoda. Viševalentni joni prisutni u mleku i mlečnim proizvodima (npr.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) mogu da grade helatne komplekse sa lekovitim supstancama iz različitih grupa (npr. bisfosfonati (147), tetraciklini (148) i fluorohinoloni (149)). Kompleksi koji nastaju na ovaj način nisu raspoloživi za apsorpciju. Jedan od mehanizama interakcije između mleka i lekovitih supstanci je njihovo vezivanje za proteine mleka. Kazein je glavni protein mleka (čini približno 85% ukupnog sadržaja proteina) i pokazano je da vezivanje lekovite supstance za proteine mleka uglavnom zavisi od njenog vezivanja za kazein (150).

### 1.1.6. Veza između apsorpcije i bioraspoloživosti lekovite supstance

U literaturi se često apsorpcija lekovite supstance poistovećuje sa njenom bioraspoloživošću, zbog čega je ova dva termina i njihov međusobni odnos potrebno jasno definisati. Intestinalna apsorpcija predstavlja prolazak leka kroz mukoznu membranu GIT-a tj. čim lekovita supstanca prođe kroz ovu membranu može se smatrati apsorbovanom (151). Bioraspoloživost se definiše kao količina lekovite supstance koja nepromenjena dospeva u sistemska cirkulaciju i predstavlja se sledećom opštom jednačinom:

$$F = F_a \times F_g \times F_h \quad \text{[jednačina 5]}$$

gde je  $F_a$  apsorbovana frakcija lekovite supstance, a  $F_g$  i  $F_h$  su frakcije koje ne podležu metabolizmu u zidu GIT-a ( $F_g$ ) i jetri ( $F_h$ ).

Dakle, bioraspoloživost lekovite supstance može da bude jednaka ili manja od intestinalne apsorpcije (apsorbovana frakcija) u zavisnosti od obima presistemskeg metabolizma (152).

Nakon oralne primene,  $C_{\max}$  i PIK se, prateći linearni jednodimenzionalni model mogu izraziti jednačinama 6 i 7:

$$C_{\max} = \frac{K_a * F * Doza}{V_d(K_a - K_e)} * (e^{-K_e * t} - e^{-K_a * t}) \quad \text{[jednačina 6]}$$

$$PIK = \frac{F * Doza}{Cl} \quad \text{[jednačina 7]}$$

gde su  $K_a$  i  $K_e$  konstante prvog reda za apsorpciju i eliminaciju, a  $V_d$  je volumen raspodele lekovite supstance i  $Cl$  je klirens. Brzina apsorpcije i eliminacije imaju značajan uticaj na dva farmakokinetička parametra;  $C_{\max}$  i  $t_{\max}$ .

## 1.2. Biofarmaceutska klasifikacija lekovitih supstanci

Kao što je već pomenuto, rastvorljivost i permeabilnost su ključni biofarmaceutski faktori od kojih zavisi intestinalna apsorpcija lekovite supstance (69, 153). Amidon i saradnici (69) su ovaj koncept implementirali u Biofarmaceutski sistem klasifikacije u okviru kojeg su lekovite supstance klasifikovane u četiri grupe zavisno od njihove rastvorljivosti i permeabilnosti. Takođe, ove osobine lekovite supstance su kombinovane sa brzinom rastvaranja lekovite supstance iz farmaceutskog oblika da bi se identifikovali ograničavajući faktori za apsorpciju lekovite supstance i izabrao odgovarajući pristup razvoju formulacije leka namenjenog za oralnu primenu. BCS je opšte prihvaćen, naučno zasnovan sistem, koji se primenjuje u ranim fazama razvoja leka (154), ali i kasnije u njegovoj regulatornoj proceni (18). Uprkos tome, još uvek ne postoji jasno definisana lista lekovitih supstanci po BCS klasama. Naime, permeabilnost i rastvorljivost lekovite supstance zavise od velikog broja faktora, te je za njihovu procenu moguće primeniti različite metode ispitivanja. Nekoliko istraživačkih grupa se bavilo provizornom klasifikacijom velikih setova podataka kao što je set od 200 oralnih lekovitih preparata dostupnih u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) (155), Model lista esencijalnih lekova Svetske zdravstvene organizacije (156-158), set generičkih lekovitih preparata odobrenih za promet između 2000. i 2011. godine u SAD-u (159) ili klasifikacijom najčešće izdavanih lekova (160). Međutim, ovi pokušaji provizorne klasifikacije nemaju regulatorni značaj, jer su se istraživači uglavnom oslanjali na opisne, farmakopejske i literaturne podatke za rastvorljivost i permeabilnost, koji nisu uvek u skladu sa odgovarajućim regulatornim zahtevima.

### 1.2.1. Modifikacije Biofarmaceutskog sistema klasifikacije

Kriterijumi za klasifikaciju lekovite supstance kao visoko/nisko permeabilne i visoko/nisko rastvorljive u okviru BCS su okarakterisani kao konzervativni od strane velikog broja eksperata i predloženo je nekoliko modifikovanih sistema za klasifikaciju sa ciljem prevazilaženja uočenih ograničenja (70, 161-169).

Wu i Benet (163) su kroz koncept Biofarmaceutskog sistema klasifikacije na osnovu dispozicije leka (engl. *Biopharmaceutics drug disposition classification system*, BDDCS) predložili da se obim metabolizma leka koristi kao zamena za permeabilnost s obzirom na to da su podaci o obimu metabolizma dostupniji i konzistentniji u odnosu na podatke o permeabilnosti lekovite supstance. U ovom sistemu, obim metabolizma (opisan kao visok ili nizak) zamenjuje permeabilnost. BDDCS je privukao interesovanje naučnika, jer je proširio koncept BCS uzimajući u obzir i proces eliminacije lekovite supstance, kao i uticaj efluksa i infliksa transportera na proces apsorpcije (170). Benet i saradnici su, koristeći BDDCS sistem, klasifikovali preko 900 lekovitih supstanci (171), a primenili su i računarske metode da bi predvideli BDDCS grupu novih lekovitih supstanci na osnovu njihove strukture (172). Bitno je napomenuti da su EMA i FDA prihvatile obim metabolizma kao alternativni kriterijum za procenu obima apsorpcije (17, 173).

Butler i Dressman (164) su predstavili koncept prema kojem su za supstance iz BCS grupe 2 permeabilnost i rastvorljivost međusobno kompenzatorne. Koncept je nazvan Razvojni sistem klasifikacije (engl. *Developability classification system*, DCS) i njegov ključni doprinos je mogućnost razlikovanja nisko rastvorljivih lekovitih supstanci, kod kojih je jednostavnom kontrolom veličine čestica moguće postići potpuno rastvaranje tokom prolaska kroz tanko crevo, od onih lekovitih supstanci kod kojih će verovatno biti potrebno da se primeni složeniji formulacioni pristup da bi se postigla zadovoljavajuća rastvorljivost i, posledično, biorasploživost. Rosenberger i saradnici (174) su modifikovali DCS kako bi ga još više prilagodili potrebama razvoja formulacije (engl. *Refined developability classification system*, rDCS). Na primer, pošto doza lekovite supstance često nije precizirana na početku razvoja formulacije, u rDCS se može primeniti niz potencijalnih doza. Nadalje, zavisno od fizičko-hemijskih osobina lekovite supstance, nakon standardnih ispitivanja rastvorljivosti i permeabilnosti, rDCS daje preporuke za dalja specifična ispitivanja. Takođe, rDCS omogućava poređenje rezultata ispitivanja rastvorljivosti i permeabilnosti dobijenih putem internih protokola, pružajući farmaceutskim kompanijama veću fleksibilnost u dizajnu protokola ispitivanja. Naime, rDCS daje standardni set supstanci za koje postoje podaci o njihovoj rastvorljivosti u humanoj intestinalnoj tečnosti u preprandijalnim uslovima (engl. *Fasted-state human intestinal fluid*, FaHIF) tako da svaka farmaceutska kompanija može da koristi sopstveni protokol za određivanje rastvorljivosti i da izvrši korelaciju dobijenih *in vitro* vrednosti sa *in vivo* vrednostima rastvorljivosti u FaHIF. Za permeabilnost je takođe dat set supstanci sa poznatim  $P_{eff}$  vrednostima i svaka farmaceutska kompanija može izvršiti korelaciju svojih podataka o permeabilnosti sa datim  $P_{eff}$  vrednostima bez obzira na metodu koja je korištena za *in vitro* određivanje permeabilnosti

Sugano (166) je proširio BCS koncept definisanjem granice za permeabilnost uzimajući u obzir faktore koji ograničavaju permeabilnost intestinalne membrane (nepokretni vodeni sloj i/ili epitelna membrana). Ova klasifikaciona šema je poznata pod nazivom Fa sistem klasifikacije (engl. *Fa classification system*, FaCS).

Macheras i Karalis (175) su uveli nebinarni biofarmaceutski sistem klasifikacije, takozvani AB $\Gamma$  sistem, koji predstavlja ternarni sistem zasnovan na bilo kojoj kombinaciji rastvorljivosti i permeabilnosti koja dovodi do procenta intestinalno apsorbovanog leka kategorisanog kao:

(A)  $Fa \leq 0,20$ ; (B)  $0,20 < Fa < 0,90$ ; ( $\Gamma$ )  $Fa \geq 0,90$ .

Pri čemu, AB $\Gamma$  sistem definiše permeabilnost i rastvorljivost kao “nisku”, “umerenu” ili “visoku”.

U okviru ICH smernice M9 (18), prepoznata je, takođe, kategorija supstanci koje pokazuju umerenu (engl. *moderate*) permeabilnost, pri čemu su kao granice između različitih kategorija definisane odgovarajuće vrednosti stepena apsorpcije (Fa):

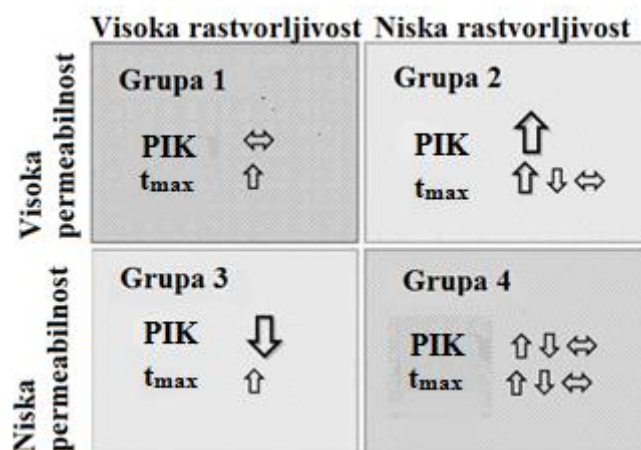
visoka permeabilnost -  $Fa \geq 0,85$ ;

umerena permeabilnost -  $0,50 < Fa < 0,84$ ;

niska permeabilnost -  $Fa < 0,50$ .

### 1.3. Predviđanje uticaja hrane na apsorpciju lekova

Prisustvo hrane u GIT-u može značajno da utiče na apsorpciju lekovite supstance. Za predviđanje interakcija lekova i hrane u ranoj fazi razvoja leka primenjivani su različiti *in vitro/in vivo/in silico* pristupi. Fleisher i saradnici (99) su zaključili da se efekat hrane na obim apsorpcije lekovite supstance iz preparata sa trenutnim oslobađanjem može predvideti na osnovu BCS grupe lekovite supstance (Slika 4). Wu i Benet (163) su dodali vreme potrebno da se dostigne najveća koncentracija lekovite supstance u sistemske cirkulaciji ( $t_{max}$ ) kao parametar koji je potrebno razmotriti prilikom procene uticaja hrane. Međutim, na osnovu BCS klasifikacije nije moguće kvantitativno predvideti promenu u obimu apsorpcije lekovite supstance (176).



Slika 4. Predviđanje uticaja obroka sa visokim sadržajem lipida na apsorpciju lekovite supstance u zavisnosti od grupe BCS prema (99, 163)

*In vivo* studije na životinjama, naročito psima, se često sprovode pre kliničkih studija da bi se predvideo potencijalni efekat hrane na apsorpciju lekova kod čoveka. Međutim, potreban je poseban oprez prilikom tumačenja rezultata ovih studija zbog velikih anatomskih i fizioloških razlika između čoveka i psa, kao što su razlike u građi epitela, pH vrednosti gastrointestinalne tečnosti, anatomiji kolona, prisutnim transporterima i metaboličkim enzimima (176).

*In vitro* procena uticaja hrane uobičajeno podrazumeva ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz farmaceutskog oblika u fiziološki zasnovanim biorelevantnim medijumima, koji simuliraju sastav postprandijalne tečnosti u GIT-u. Ciljevi *in vitro* procene uticaja hrane na ponašanje oralno primenjenog lekovitog preparata u lumenu GIT-a su procena rizika povezanog sa primenom leka uz obrok, uočavanje potencijalnih efekata hrane, poređenje različitih formulacija pre početka kliničke studije i potencijalno izostavljanje studija bioekvivalencije (pod uslovom da se efekti hrane vezani za metabolizam i limfni transport razmatraju odvojeno) (177).

Rezultati *in vitro* studija se koriste i kao ulazni podaci za fiziološki zasnovano farmakokinetičko modelovanje (engl. *Physiologically based pharmacokinetic, PBPK, modeling*). PBPK modelovanje se opisuje kao kompleksna *in silico* alatka, koja se, između ostalog, može koristiti za predviđanje uticaja hrane na apsorpciju lekovite supstance (176). Pored PBPK modelovanja, za *in silico* predviđanje efekata hrane se mogu koristiti i tehnike za naprednu analizu podataka kao što su algoritam slučajnih šuma (engl. *Random forests, RF*) i algoritam potpornih vektora sa polinomijalnom kernel funkcijom (engl. *Support vector machine with polynomial kernel function, SVMPoly*).

### 1.3.1. Primena *in vitro* metoda za procenu uticaja hrane

Uređaji tipa korpice i lopatice (opisani u Evropskoj farmakopeji kao uređaji tipa 1 i 2) su zbog svoje robustnosti i jednostavnosti široko korišteni u farmaceutskoj industriji za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz farmaceutskih preparata (najviše u kontroli kvaliteta lekova). Uređaji tipa lopatice su u kombinaciji sa biorelevantnim medijumima često korišteni za ispitivanje i predviđanje uticaja hrane i faktora formulacije na brzinu rastvaranja lekovite supstance iz formulacija sa trenutnim oslobađanjem lekovite supstance (58, 83, 84, 178, 179). Za ispitivanje uticaja hrane na oslobađanje lekovite supstance iz preparata sa modifikovanim oslobađanjem, najčešće su korišteni uređaji tipa cilindra sa povratnim pokretanjem (uređaj tip 3) i tipa protočne ćelije (uređaj tip 4) (180-182). Međutim, s obzirom na to da prisustvo hrane dovodi do složenih promena u GIT-u, savremene *in vitro* metode za predviđanje uticaja hrane predstavljaju različite

dinamičke modele GIT-a pomoću kojih je, pored brzine rastvaranja, moguće simultano praćenje i drugih faktora od kojih zavisi apsorpcija lekovite supstance.

#### *Biorelevantni medijumi koji simuliraju sastav pre- i postprandijalne gastrointestinalne tečnosti*

Dressman i saradnici (67) su 1998. godine predstavili biorelevantne medijume koji simuliraju intestinalnu tečnost u preprandijalnim (engl. *Fasted state simulated intestinal fluid*, FaSSIF) i postprandijalnim (engl. *Fed state simulated intestinal fluid*, FeSSIF) uslovima. Njihov sastav se uglavnom bazirao na rezultatima ispitivanja sastava humanih aspirata dobijenih nakon primene tečnih obroka. Sastav prvobitnih medijuma je nešto kasnije korigovan u cilju povećanja njihove biorelevantnosti i fizičke stabilnosti (FaSSIF-V2 i FeSSIF-V2), a predstavljen je i novi medijum koji simulira želudačnu tečnost u postprandijalnim uslovima (engl. *Fed state simulated gastric fluid*, FeSSGF) (90). Vertzoni i saradnici (50) su 2005. godine objavili sastav medijuma koji simulira želudačnu tečnost u preprandijalnim uslovima (engl. *Fasted state simulated gastric fluid*, FaSSGF), a 2010 godine (183) su predložili sastav medijuma koji simulira fizičko-hemijske karakteristike preprandijalne i postprandijalne tečnosti u kolonu (engl. *Fasted state simulated colonic fluid*, FaSSCoF i *Fed state simulated colonic fluid*, FeSSCoF)

Markopoulos i saradnici (184) su predložili četiri nivoa simulacije sastava luminalne tečnosti. Na nivou 0 su jednostavni vodeni rastvori, čiji je pH podešen (obično dodatkom pufera) tako da predstavlja pH vrednost u određenom delu GIT-a. Na ovom nivou puferi kapacitet može, ali i ne mora da bude fiziološki relevantan, jer je cilj, pre svega, održavanje određene pH vrednosti u toku ispitivanja. Na nivou I se podešavaju i pH vrednost i puferi kapacitet tako da oslikavaju fiziološke vrednosti u onoj meri u kojoj je to moguće. U medijume na nivou II se dodaju komponente žuči, lipidi iz hrane i ključni proizvodi varenja da bi se simulirali kapacitet solubilizacije luminalnih tečnosti i razlike u sastavu luminalne tečnosti između preprandijalnog i postprandijalnog stanja. Medijumi na nivou III imaju najkompleksniji sastav i sadrže, pored ostalog, proteine i enzime koji su obično prisutni u vodenoj fazi luminalnog sadržaja i omogućavaju da se uzme u obzir i uticaj viskoziteta na oslobađanje lekovite supstance iz preparata. Na nivou III je moguće uzeti u obzir i uticaj gastrointestinalne hidrodinamike. Zavisno od toga koji deo GIT-a i koji uslovi doziranja se žele simulirati, unutar svakog nivoa se mogu varirati vrsta i broj komponenti u medijumu.

Georgaka i saradnici (185) su na osnovu podataka dobijenih posle primene referentnog obroka, korigovali sastav medijuma koji simulira stanje u ascedentnom i proksimalnom kolonu.

Iako su biorelevantni medijumi opšte prihvaćeni, njihova primena u rutinskoj analizi lekova je ograničena usled kompleksnog sastava, visoke cene i nestabilnosti. U cilju prevazilaženja ovog problema, predložena je primena tzv. "pojednostavljenih" fiziološki zasnovanih medijumima. Ovi medijumi sadrže sintetske surfaktante (npr. natrijum-laurilsulfat ili polisorbata 80) i imaju fizičko-hemijske osobine slične biorelevantnim medijumima nivoa II (*FaSSIF* i *FeSSIF*). Uprkos tome što ne oslikavaju sve relevantne fizičko-hemijske parametre na mestu oslobađanja i apsorpcije lekovite supstance, primenom ovih medijuma je moguće, do određene mere, predvideti *in vivo* ponašanje lekovitog preparata (186, 187). Pod uslovom da se pokaže da su rastvorljivost i brzina rastvaranja neke lekovite supstance iz farmaceutskog oblika u pojednostavljenim medijumima slične vrednostima dobijenim u biorelevantnim medijumima pripremljenim sa komponentama žuči, pojednostavljeni medijumi mogu biti vrlo korisni, kako u fazi skrininga različitih formulacija, tako i u fazi razvoja testova za kontrolu kvaliteta odabrane formulacije. Iako se očekuje da se pojednostavljeni medijumi mogu koristiti kao zamena za biorelevantne medijume, njihovu primenljivost je potrebno potvrditi u zavisnosti od osobina lekovite supstance i ispitivanog preparata. Različite istraživačke grupe su pokazale da je za svaku formulaciju potrebno odrediti optimalan sastav pojednostavljenih medijuma u pogledu vrste i koncentracije surfaktanata, jer se variranjem ovih parametara mogu dobiti vrlo različiti profili brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata. Iako je za razvoj takvih testova potrebno vreme, dobro dizajniran pojednostavljeni medijum je isplativiji u poređenju sa biorelevantnim medijumom jer ima sličnu diskriminatornu sposobnost i moć predikcije *in vivo* ponašanja preparata, uz veću stabilnost i manju cenu (186, 187).



### *Dinamički višeprostrorni modeli gastrointestinalnog trakta*

U toku poslednjih nekoliko godina razvijen je veliki broj uređaja sa ciljem verodostojne simulacije svih procesa koji su uključeni u oslobađanje i apsorpciju lekovite supstance iz GIT-a. Treba imati na umu da je i najsofisticiraniji model samo uprošten prikaz kompleksnog realnog sistema. Iz tog razloga bitno je razumeti kako i koliko model odstupa od *in vivo* sistema da bi se uspešno interpretirali dobijeni rezultati i izvršila njihova ekstrapolacija na *in vivo* sistem (188). Jedan takav model je Dinamički model želuca (engl. *Dynamic gastric model, DGM*) (189), koji omogućava *in vitro* simulaciju procesa mešanja u želucu, peristaltike i pražnjenja želuca. Pomoću ovoga modela je moguće simulirati *in vivo* ponašanje farmaceutskog oblika u preprandijalnom i postprandijalnom stanju (1).

Pored DGM, razvijeni su i drugi kompleksni simulatori GI trakta: TNO gastrointestinalni model (TIM) (190, 191) i model "sitog" želuca (*Fed stomach model, FSM*) (192)

TNO gastrointestinalni model (TIM-1) (190) je višeprostrorni, dinamički, računarski kontrolisan model gornjeg gastrointestinalnog trakta čoveka. Ovaj sistem simulira fiziološke uslove u želucu i tankom crevu, koji uključuju dinamiku mešanja, pražnjenje želuca, vreme prolaska kroz tanko crevo, pH vrednosti želuca i tankog creva, telesnu temperaturu, kao i sastav i aktivnost sekretovane GI tečnosti. U literaturi postoji svega nekoliko primera upotrebe TIM-1 sistema za karakterizaciju lekovitih preparata (193-195). Kombinovanje TIM-1 modela sa TNO TIM-2 modelom, koji simulira fiziološke uslove u debelom crevu, omogućava ispitivanje oslobađanja lekovite supstance kroz celi GIT (196).

Iako su se DGM i TNO TIM-1 modeli pokazali korisnim za ispitivanje procesa varenja i bioraspoloživosti sastojaka hrane, njihova upotreba za rutinska ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance iz čvrstih farmaceutskih oblika je nepraktična zbog velike složenosti opisanih modela, te cene i dužine trajanja testa. Da bi se proces simulacije donekle pojednostavio, razvijen je pojednostavljeni dinamički dvoprostrorni tiny-TIM sistem, koji se sastoji od želudačnog odeljka i jednog, umesto tri, odeljka za tanko crevo. Pored toga, konvencionalni želudačni odeljak je optimizovan razvojem TIM naprednog gastričnog odeljka (engl. *TIM advanced gastric compartment, TIMagc*), koji bolje simulira oblik i dinamične uslove želuca uzimajući u obzir njegov tonus, antralno mešanje i otvaranje pilorusa (1, 197, 198).

Koziolek i saradnici (192) su dizajnirali *in vitro* uređaj za ispitivanje brzine rastvaranja, koji omogućava biorelevantno simuliranje postprandijalnih uslova u želucu: model "sitog" želuca. FSM predstavlja modifikovani uređaj tipa lopatice, koji se može koristiti za ispitivanje farmaceutskih oblika pod različitim mehaničkim uslovima prisutnim tokom transporta u želucu. Tokom ispitivanja moguće je simulirati pritisak i transport uzrokovan peristaltikom želuca, te različite hidrodinamičke uslove. FSM model je omogućio biorelevantno simuliranje mehaničkih uslova prisutnih u želucu u uslovima nakon obroka, kao i uticaj položaja farmaceutskog oblika leka u želucu na brzinu rastvaranja. Pomoću FSM modela moguća je individualna simulacija i karakterizacija mehaničkih faktora koji utiču na brzinu rastvaranja lekovite supstance iz preparata. Međutim, nekoliko faktora kao što su fiziološka sekrecija, stepen pražnjenja želuca, te kompleksnost želudačanog sadržaja još uvek nisu uključeni u ovaj model. Dakle, potrebna je dalja validacija i optimizacija opisanog sistema zasnovana na analizi *in vivo* podataka da bi se otkrili kritični procesi u prolasku farmaceutskih oblika kroz želudac (192).

### **1.3.2. Primena fiziološki zasnovanih farmakokinetičkih modela za predviđanje uticaja hrane**

Fiziološki zasnovano farmakokinetičko modelovanje (engl. *Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling*) omogućava predviđanje profila koncentracije lekovite supstance u plazmi i različitim tkivima na osnovu fizičko-hemijskih i biofarmaceutskih karakteristika lekovite supstance, mesta i načina primene leka i fizioloških procesa kojima lekovita supstanca podleže. Dakle, u obzir



se uzimaju faktori koji utiču na procese apsorpcije, distribucije i eliminacije (199). U PBPK modelovanju se koriste matematički modeli za predviđanje *in vivo* podataka, dok se ulazni parametri određuju *a priori* iz *in vitro*, *in vivo* i *in silico* eksperimenata (200). Fiziološki parametri kao što su vreme prolaska kroz GIT, pH vrednost, apsorptivna površina, karakteristike pojedinih tkiva/organa itd. su ugrađeni u model, ali mogu biti modifikovani od strane korisnika.

Jedan od najpoznatijih komercijalno dostupnih softvera u kontekstu PBPK modelovanja je GastroPlus™. Osim GastroPlus™ dostupne su i druge softverske platforme kao što su Simcyp, PK-Sim®, gCOAS i GI-Sim (177, 200).

GastroPlus™ (Simulations Plus, SAD) je programski paket koji omogućava predviđanje apsorpcije, farmakokinetičkog i farmakodinamskog profila leka, kao i lek-lek interakcija kod čoveka i nekih životinjskih vrsta (201). Za predviđanje apsorpcije lekovite supstance nakon oralne primene GastroPlus™ koristi Unapređeni prostorni model apsorpcije i tranzita (engl. *Advanced compartmental absorption transit*, ACAT) (202).

#### *Unapređeni prostorni model apsorpcije i tranzita*

Unapređeni prostorni model apsorpcije i tranzita predstavlja mehanistički model koji opisuje procese kojima farmaceutski preparati i lekovite supstance podležu u GIT-u. ACAT model opisuje svaki od sledećih procesa pojedinačno pomoću odgovarajućih sistema diferencijalnih jednačina: oslobađanje lekovite supstance iz preparata, rastvaranje, precipitaciju, hemijsku degradaciju, pasivnu difuziju, influks/efluks posredovan nosačima, paracelularni transport i metabolizam u zidu creva. Većina ovih procesa se odvija linearnom kinetikom i opisuje odgovarajućim jednačinama, dok se transport posredovan nosačima i presistemički metabolizam u zidu creva opisuju Michaelis-Menten-ovom nelinearnom kinetikom. Za oralni put primene u GastroPlus™ softveru postoji mogućnost izbora farmaceutskih oblika sa trenutnim oslobađanjem (IR) (rastvori, suspenzije, tablete i kapsule) ili sa kontrolisanim oslobađanjem (CR) (200, 203).

Programski paketi za PBPK modelovanje, poput GastroPlus™-a, se mogu koristiti u različitim fazama razvoja leka, počev od istraživanja biofarmaceutskih svojstava i farmakokinetike lekovite supstance do razvoja i kliničkog ispitivanja farmaceutskih preparata (204-206). PBPK modelovanje se, u kombinaciji sa *in vitro* ispitivanjima u biorelevantnim medijumima, uspešno koristi i za predviđanje uticaja hrane na apsorpciju lekovite supstance. Zhang i saradnici (207) su pomoću GastroPlus™ programa razvili PBPK model da bi objasnili pozitivan efekat hrane na apsorpciju slabe baze sa pH-zavisnom rastvorljivošću. Model je uspešno predvideo profile koncentracije lekovite supstance u krvi u preprandijalnom i postprandijalnom stanju. Pomenuti autori su pokazali da je niska bioraspoloživost u preprandijalnom stanju uzrokovana precipitacijom lekovite supstance, što dovodi do njene nepotpune apsorpcije, dok su produženo vreme precipitacije i povećana rastvorljivost *in vivo* identifikovani kao ključni mehanizmi odgovorni za pozitivan efekat hrane. Cvijić i saradnici (84) i Radwan i saradnici (58, 83) su koristili GastroPlus™ program za procenu uticaja viskoziteta medijuma na raspadljivost tableta sa trenutnim oslobađanjem i posledičnu apsorpciju lekovitih supstanci BCS grupe 3. Rezultati ovih studija su pokazali da povećan viskozitet medijuma u postprandijalnom stanju značajno utiče na raspadljivost farmaceutskog oblika i posledično na brzinu rastvaranja i apsorpciju lekovitih supstanci koje karakteriše niska permeabilnost i prisustvo "apsorpcionog prozora". Marković i saradnici (208) su primenom PBPK modelovanja pomoću GastroPlus™ programa ispitivali uticaj promena fizioloških uslova u GIT-u uzrokovanih prisustvom hrane na apsorpciju rebamipida i pokazali da ove promene dovode do nešto smanjene apsorpcije rebamipida u postprandijalnom stanju. Ukoliko su PBPK modeli validirani na osnovu kliničkih podataka za preprandijalno i postprandijalno stanje, mogu se dalje koristiti, umesto dodatnih kliničkih studija, za simuliranje ishoda u postprandijalnom stanju za nove doze, izmene u formulaciji ili različite farmaceutske oblike lekovite supstance (177).

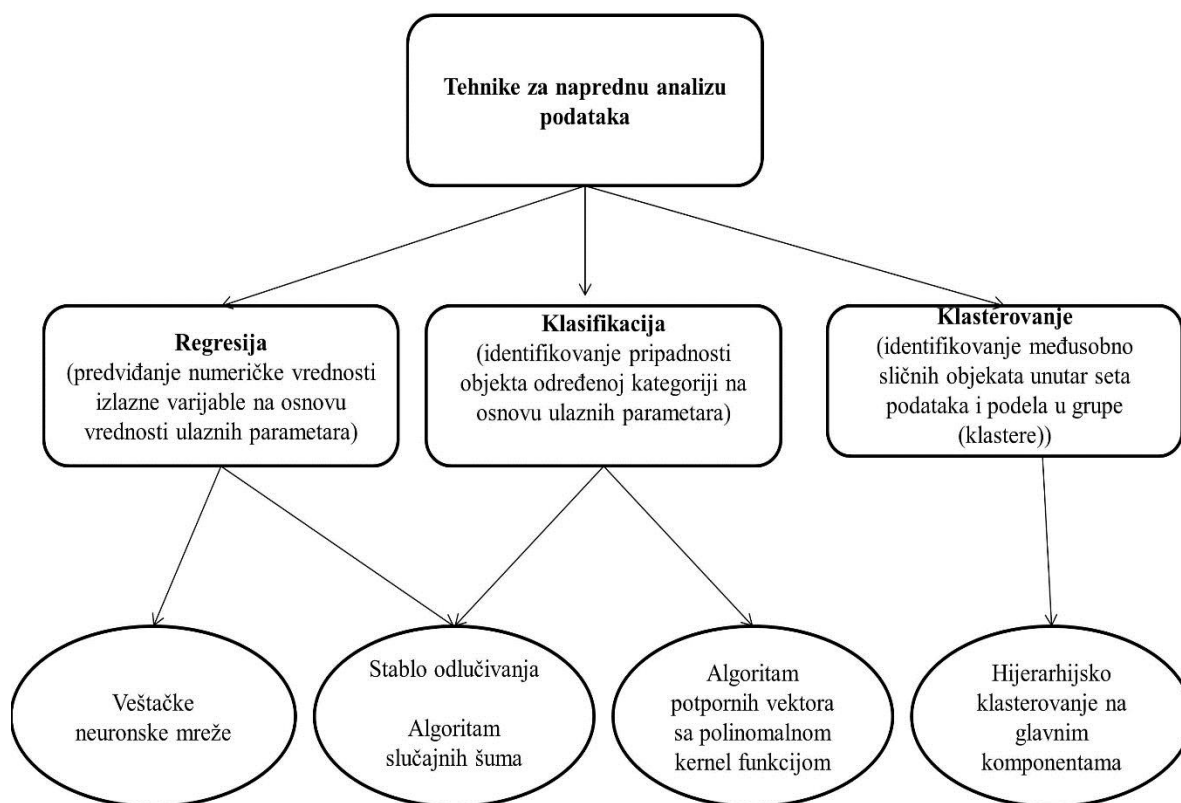


## 2. NAPREDNA ANALIZA PODATAKA

Napredna analiza podataka predstavlja primenu različitih matematičkih tehnika koje omogućavaju istraživanje velikih skupova podataka s ciljem otkrivanja složenih odnosa i međusobne povezanosti informacija. Savremene tehnike napredne analize podataka obuhvataju grupisanja/klasterovanje, klasifikaciju, regresiju i pravila asocijacije (209). Dostupne su u obliku velikog broja računarskih programa među kojima su najšire primenjivani RapidMiner Studio (RapidMiner GmbH, Dortmund, Germany) i R Studio (R Studio Inc., Boston, Massachusetts). Oba programa predstavljaju sistem otvorenog koda za analizu podataka, mašinsko učenje i prediktivnu analizu (210). U nastavku su objašnjeni osnovni principi najčešće korištenih tehnika za naprednu analizu podataka.

### 2.1. Pregled tehnika za naprednu analizu podataka

Na Slici 5 su prikazane najčešće korištene tehnike za naprednu analizu podataka.



Slika 5. Pregled tehnika za naprednu analizu podataka

#### 2.1.1. Veštačke neuronske mreže

Veštačke neuronske mreže (engl. *Artificial neural networks*, ANN) su računarski sistemi koji su inspirisani strukturom i funkcionalnim aspektima bioloških neuronskih mreža. Kao i u biološkim neuronskim mrežama, osnovna komponenta veštačkih neuronskih mreža je neuron ili perceptron, koji predstavlja jednostavnu matematičku jedinicu, koja prima jedan ili više ulaznih signala i stvara

izlazni signal. Veštačke neuronske mreže se sastoje od velikog broja neurona organizovanih u strukturu koja se naziva topologija ili arhitektura mreže (211). Poznato je da učinak neuronskih mreža zavisi od broja neurona. Premalo neurona dovodi do lošeg predviđanja, dok previše neurona može da dovede do preteranog treniranja mreža (engl. *overfitting*) što opet vodi ka lošem predviđanju. Dakle, potrebno je pronaći ravnotežu između postizanja što boljeg učinka mreža i njihove arhitekture (212).

Jedan od najčešće korištenih tipova neuronskih mreža su višeslojni perceptroni (engl. *Multilayer perceptrons*, MLP). Ovaj tip mreža se sastoji iz ulaznog, skrivenog (jedan ili više slojeva) i izlaznog sloja, koji su međusobno povezani. Sve slojeve, osim ulaznog, čine identični neuroni. MLP je model nerekurentnih neuronskih mreža, koji koristi propagaciju unazad za trening mreža, koji teče u dve faze. Prva faza je nerekurentna i u njoj se uspostavljaju težinske (engl. *weight*) veze između neurona i ulazni signal se širi kroz mreže, sloj po sloj, dok ne stigne do izlaza. U ovoj fazi su promene ograničene na aktivacijske potencijale i izlaze neurona u mrežama. U drugoj, povratnoj fazi, stvara se signal greške upoređivanjem izlaza mreža sa željenim odgovorom. Dobijeni signal greške se širi kroz mreže, opet sloj po sloj, ali ovaj put širenje ide unazad. U ovoj fazi se sukcesivno rade poboljšanja težinskih veza u mrežama. Ovaj proces se ponavlja određen broj ciklusa učenja nakon čega mreže konvergiraju u oblik u kojem je greška u predviđanju najniža (mreže su naučile određenu ciljanu funkciju). Kao funkcija aktiviranja se najčešće koristi sigmoidna funkcija (211, 213, 214).

Jedna od glavnih prednosti veštačkih neuronskih mreža je njihova sposobnost da opišu bilo koju nelinearnu dinamiku. Različite mreže sa različitim topologijama i parametrima mogu dati iste rezultate tj. ista predviđanja. Veštačke neuronske mreže se uspešno primenjuju u različitim oblastima doprinoseći rešavanju različitih naučnih i tehnoloških problema (215).

### **2.1.2. Hijerarhijsko klasterovanje na glavnim komponentama**

Klasterovanje je jedna od najvažnijih tehnika za naprednu analizu podataka. U literaturi se klasterovanje najčešće deli na hijerarhijsko i nehijerarhijsko (particiono) klasterovanje. Hijerarhijsko klasterovanje se koristi za identifikovanje grupa (klastera) međusobno sličnih objekata unutar seta podataka, dok se particiono klasterovanje koristi za podelu seta podataka u grupe (216). Hijerarhijsko klasterovanje na glavnim komponentama (engl. *Hierarchical clustering on principal components*, HCPC) je hibridni pristup koji kombinuje analizu glavnih komponenti (engl. *Principal component analysis*, PCA), hijerarhijsko i nehijerarhijsko klasterovanje. PCA se smatra preprocesnim korakom pre klasterovanja, čija je uloga uklanjanje šuma (engl. *denoising step*) tj. prve komponente zadržavaju esencijalne informacije dok poslednje predstavljaju šum koji ometa proces klasterovanja. Na ovaj način se osigurava veća stabilnost dobijenih klastera. U sledećem koraku se sprovodi hijerarhijsko klasterovanje da bi se definisao broj klastera. Hijerarhijsko klasterovanje se sprovodi prema Ward-ovom kriterijumu na osnovu procene varijanse (inercija) kao i na osnovu metode glavnih komponenti. Prilikom definisanja broja klastera algoritam bira onaj broj klastera čija suma varijansi se najviše približava varijansi uzorka (seta) koji se posmatra. Kao poslednji korak se sprovodi nehijerarhijsko klasterovanje pomoću K-means algoritma sa brojem klastera koji je određen u prethodnom koraku (217).

### **2.1.3. Stablo odlučivanja**

Stablo odlučivanja (engl. *Decision tree*) je moćna i popularna računarska tehnika, koju je razvio Breiman (218) i koristi se i za klasifikaciju i za regresiju. Poznata je i pod nazivom klasifikaciona i regresiona stabla (engl. *Classification and regression Trees*, CART). Ukoliko je zavisna varijabla kategorička dobija se klasifikaciono stablo. CART algoritam kreira stablo odluke počev od "korena

stabla” koristeći ulazne varijable. Algoritam bira najpogodniju (statistički najznačajniju) ulaznu varijablu za grananje stabla i najpogodniju vrednost te varijable da definiše grananje. Svaki čvor se grana u dva čvora, koji onda postaju čvorovi za sledeće grananje. Grananje stabla se nastavlja dok god je grananje moguće ili dok stablo ne zadovolji jedan od faktora zaustavljanja koje primenjuje korisnik (engl. *prune*). Čvorovi koji se više ne granaju su terminalni čvorovi i oni sadrže predviđenu klasu (218, 219).

#### 2.1.4. Algoritam potpornih vektora sa polinomialnom kernel funkcijom

Algoritam potpornih vektora sa polinomijalnom kernel funkcijom (engl. *Support vector machine with polynomial kernel function*, SVMPoly) je klasifikacioni algoritam i funkcioniše tako što izračunava optimalnu hiperravan, koja razdvaja klase u visokodimenzionalnom prostoru (220). Formiranje hiperravni deli dve klase na osnovu “maksimalne margine”. Hiperravni naležu na jedan ili više podataka iz svoje klase i ti podaci predstavljaju potporne vektore. Ukoliko se podaci ne mogu linearno rastaviti u datom prostoru, koristi se kernel funkcija, koja omogućava preslikavanje podataka u viši dimenzionalni prostor tako da se hiperravni mogu postaviti. Postoji veliki broj kernela među kojima su najpopularniji linearni, polinomialni i Gausov kernel. SVM se smatra jednim od najtačnijih klasifikacionih algoritama i ima široku primenu i bioinformatički. Bitno je istaći da je to binarni klasifikator, ali se može koristiti i za veći broj klasa, kombinovanjem rezultata više nezavisnih binarnih klasifikatora (220, 221).

#### 2.1.5. Algoritam slučajnih šuma

Algoritam slučajnih šuma (engl. *Random forests*, RF) kreira veliki broj različitih stabala koja učestvuju u odlučivanju u slučaju klasifikacije ili pronalazi srednju vrednost pri regresiji. Iz trening seta, *bootstrap* uzorkovanjem se dobija novi set koji je po veličini jednak originalnom. *Bootstrap* uzorkovanje iz populacije izdvaja uzorak u kome se neke instance iz populacije ponavljaju, dok su druge izostavljene. Potom se nad svakim novim setom kreira jedno modifikovano stablo. Pri uzorkovanju, oko 33% originalnih podataka se ne iskoristi. Taj skup podataka se naziva „out-of-bag“ (OOB) skup, te je pomoću njega moguće provesti unakrsnu validaciju svakog kreiranog stabla. Takva unakrsna validacija predstavlja dobar osnov za procenu greške RF algoritma. Takođe, testiranje se izvodi paralelno uz kreiranje stabla. U toku stabilizacije OOB greške moguće je prekinuti dalje kreiranje stabala. Proces uzorkovanja i kreiranja stabala se ponavlja onoliko puta koliko će biti stabala u slučajnoj šumi, dok je  $N = 100$  pretpostavljena vrednost. Svaki takav uzorak je drugačiji, te nastaje šum naspram originalnog skupa podataka. Zato je svako izgrađeno stablo različito. Prisustvo šuma je pozitivno, jer dovodi do smanjenja varijanse. Klasifikaciona i regresiona stabla, koja se koriste kao osnovni modeli u RF, sklona su preteranom treniranju. U tom slučaju, model donosi loše odluke pri klasifikaciji novih podataka, jer ima nisku vrednost pristranosti (engl. *Bias*). S druge strane, sposobnost pojedinačnog stabla odluke da prepozna kompleksne veze između atributa i ciljne klase je ključno jer je ansambl stabala dobar samo ukoliko osnovni modeli daju dobre rezultate. Svako stablo kreirano na uzorku populacije je identično distribuirano, stoga je očekivanje samog ansambla jednako kao i kod svakog pojedinačnog stabla. Kao rezultat, pristranost slučajnih šuma i pojedinačnih stabala je jednaka, dok smanjenje varijanse podrazumeva bolje rezultate predviđanja. Cilj algoritma je da se što više smanji korelacija između pojedinačnih stabala kako bi se pokrila što veća varijacija podataka bez povećanja varijanse celog ansambla stabala (222).

## 2.2. Primena tehnika za naprednu analizu podataka u razvoju i karakterizaciji lekova

Tehnike za naprednu analizu podataka su uglavnom korištene za predviđanje procenta apsorbovanog leka na osnovu izračunatih molekulskih deskriptora (223-225) ili pak za predviđanje permeabilnosti lekovite supstance na Caco-2 ćelijama ili veštačkim membranama (PAMPA test), takođe, na osnovu vrednosti molekulskih deskriptora (226-229).

Chatzizacharia i Hatzivramidis (230) su primenili tehniku klasterovanja da bi uspostavili nove "okvire" za klasifikaciju lekovitih supstanci u četiri kalase BCS i BDDCS sistema. Daousani i saradnici (231) su istraživali vezu između farmakokinetičkih osobina lekovitih supstanci i njihove klasifikacije prema BCS i BDDCS sistemima koristeći analizu glavnih komponenti (engl. *Principal components analysis*, PCA) i hijerarhijsko klasterovanje (engl. *Hierarchical clustering analysis*, HCA). Pomoću ovih tehnika su otkrili da lekovite supstance, koje pokazuju visok procenat vezivanja za proteine plazme, obično imaju i visok nivo metabolizma. Osim toga, uočili su da lekovite susptance sa velikim prividnim volumenom distribucije, imaju i duže poluvreme eliminacije (231).

Khandelwal i saradnici (232) su koristili tehnike rekruzivne raspodele (engl. *Recursive partitioning*, RP), slučajnih šuma i potpornih vektora (engl. *Support vector machine*, SVM) da bi na osnovu vrednosti molekulskih deskriptora predvideli BDDCS klase lekovitih supstanci. Pham-The i saradnici (233) su primenili linearnu diskriminacionu analizu (engl. *Linear discriminant analysis*, LDA), kvadratnu diskriminacionu analizu (engl. *Quadratic discriminant analysis*, QDA) i binarnu logističku regresiju (engl. *Binary logistic regression*, BLR) za predviđanje rastvorljivosti i permeabilnost lekovitih supstanci na osnovu vrednosti odabranih molekulskih deskriptora. Esaki i saradnici (234) su pomoću tehnika slučajnih šuma, potpornih vektora sa kernelom sa radijalnom osnovom (engl. *Support vector machine with radial basis kernel*, radial SVM) i linearnim kernelom (engl. *Linear kernel*, linear SVM) razvili klasifikacione modele za predviđanje permeabilnosti (visoka/niska), rastvorljivosti (visoka/niska) i obima apsorpcije (niska, srednja ili visoka) na osnovu vrednosti molekulskih deskriptora. Hou i saradnici (235) su koristili SVM algoritam za klasifikaciju lekovitih supstanci na osnovu visokog/niskog procenta apsorpcije ( $F_a > 30\%$  ili  $F_a \leq 30\%$ ).

Newby i saradnici (236) su za predviđanje rastvorljivosti i permeabilnosti lekovitih supstanci na osnovu molekulskih deskriptora koristili metode klasifikacionih i regresionih stabala (engl. *Classification and regression trees*, C&RTs). Oni su pokazali da se prediktivna moć modela za predviđanje permeabilnosti povećava ukoliko se kao jedan od ulaznih parametara, pored molekulskih deskriptora, koristi predviđena ili eksperimentalno određena rastvorljivost lekovite supstance. Iste metode (C&RTs) su koristili da bi na Caco-2 i MDCK ćelijskim linijama odredili permeabilnost lekovite supstance koja odgovara visokom stepenu apsorpcije. Potom su pomoću stabala odluke razvili klasifikacioni model za predviđanje apsorpcije lekovite supstance na osnovu permeabilnosti, rastvorljivosti i vrednosti odabranih molekulskih deskriptora. Primetili su da rastvorljivost nije bila značajna za predviđanje apsorpcije lekovite supstance u meri u kojoj su očekivali. Dobijeni rezultati su pokazali da je permeabilnost najvažniji faktor za predviđanje apsorpcije posle oralne primene lekovite supstance. Naime, tokom razvoja C&RT modela algoritam je uvek birao permeabilnost kao statistički najznačajniju varijablu za početak grananja stabla, dok rastvorljivost i drugi parametri nisu birani čak ni u sekundarnom grananju.

S obzirom na to da je za uspešno predviđanje *in vivo* ponašanja lekovite supstance potrebno uzeti u obzir veliki broj kompleksnih i varijabilnih faktora te njihovu međusobnu povezanost, očekuje se da primena tehnika za naprednu analizu podataka može pružiti bolji uvid i mehanističko razumevanje ovih fenomena i olakšati njihovo predviđanje.

### 3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Osnovni cilj istraživanja je da se proceni mogućnost primene tehnika za naprednu analizu podataka u biofarmaceutskoj karakterizaciji lekova kroz:

- razvoj i validaciju modela za predviđanje humane intestinalne permeabilnosti lekovite supstance na osnovu odabranih molekulskih deskriptora;
- identifikaciju kritičnih vrednosti biofarmaceutskih faktora koji utiču na intestinalnu apsorpciju lekovitih supstanci i uspostavljanje modifikovanog biofarmaceutskog sistema klasifikacije;
- identifikaciju fizičko-hemijskih, biofarmaceutskih i farmakokinetičkih faktora i njihovih interakcija koje utiču na intestinalnu apsorpciju lekovitih supstanci i njihovu biofarmaceutsku klasifikaciju;
- razvoj i validaciju klasifikacionih modela za predviđanje uticaja hrane na intestinalnu apsorpciju lekova;
- biofarmaceutsku karakterizaciju izabranih model supstanci koje pokazuju nisku rastvorljivost i nisku permeabilnost zasnovanu na primeni fiziološki zasnovanih farmakokinetičkih modela, u kombinaciji sa rezultatima dobijenim ispitivanjem brzine rastvaranja lekovite supstance iz tableta sa trenutnim oslobađanjem.





## **II EKSPERIMENTALNI DEO**



## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Formiranje baze podataka

U cilju formiranja baze podataka za analizu sprovedena je u okviru naučnih baza *Pubmed* i *Google Scholar* opsežna pretraga dostupnih literaturnih podataka koji se odnose na *in vivo* ispitivanje permeabilnosti lekovitih supstanci u ljudi, *biowaiver*, apsorpciju, rastvorljivost, Biofarmaceutski sistem klasifikacije, studije bioekvivalencije između oralnog rastvora i čvrstih farmaceutskih oblika i uticaj hrane na apsorpciju lekovitih supstanci.

Formirana su tri seta podataka koji sadrže model lekovite supstance izabrane na osnovu sledećih kriterijuma:

- (1) lekovite supstance za koje postoje pouzdani podaci o koeficijentu permeabilnosti određeni u okviru *in vivo* studija intestinalne perfuzije u ljudi, uključujući i supstance čije su biofarmaceutske karakteristike detaljno opisane i evaluirane u vidu FIP *Biowaiver* monografija (set podataka A);
- (2) lekovite supstance za koje je u okviru *in vivo* studija pokazana biološka ekvivalentnost između oralno primenjenog rastvora i čvrstog farmaceutskog oblika leka, uz pretpostavku da farmaceutski oblik leka ne utiče na apsorpciju (set podataka B);
- (3) lekovite supstance za koje se u literaturi navodi da pokazuju nisku rastvorljivost i nisku permeabilnost (set podataka C).

Set podataka A je sadržao biofarmaceutske karakteristike izabranih model supstanci: (i) odnos doza/rastvorljivost (engl. *Dose/solubility ratio*, D/S), (ii) procenat apsorbiranog leka (engl. *Fraction drug absorbed*, Fa) i (iii) permeabilnost (engl. *Effective permeability*, P<sub>eff</sub>), kao i odgovarajuće vrednosti molekulskih deskriptora: (iv) polarna površina molekula (engl. *Topological polar surface area*, TPSA), (v) broj donora vodonične veze (engl. *Hydrogen bond donor count*, HBD), (vi) zbir donora i akceptora vodonične veze (engl. *Sum of hydrogen bond donors (HBD) and hydrogen bond acceptors (HBA) counts*, HB).

Setovi podataka B i C su obuhvatili sledeće karakteristike izabranih model supstanci:

- (1) fizičko-hemijske karakteristike: (i) izračunati particioni koeficijent (engl. *Calculated logP*, clogP), (ii) molekulska masa (engl. *Molecular weight*, MW); (iii) TPSA, (iv) zbir donora i akceptora vodonične veze (engl. *Sum of hydrogen bond donors (HBD) and Hydrogen bond acceptors (HBA) counts*, HB);
- (2) biofarmaceutske karakteristike: (i) D/S, (ii) Fa i (iii) P<sub>eff</sub>;
- (3) farmakokinetičke karakteristike: (i) obim metabolizma leka (engl. *Extent of drug metabolism*, F<sub>m</sub>), (ii) dozno normalizovana vrednost površine ispod krive (PIK) koncentracija leka u plazmi u funkciji vremena (PIK/D), (iii) dozno normalizovana vrednost maksimalne koncentracije leka u plazmi, C<sub>max</sub>/D) i (iv) poluvreme eliminacije leka (engl. *Elimination half-life*, t<sub>1/2</sub>);
- (4) uticaj hrane definisan je kao “pozitivan”, “negativan” ili “bez efekta” i označen kao FE<sub>↑</sub>, FE<sub>↓</sub> i FE<sub>0</sub>, redom.

Odgovarajući podaci prikupljeni su pretraživanjem dostupne literature i kritički analizirani. Molekulski deskriptori su izabrani zbog njihove veze sa apsorpcijom lekovite supstance, koja je dobro opisana u literaturi (10, 20, 237). Ukoliko nisu bili dostupni eksperimentalni podaci, P<sub>eff</sub> vrednosti izabranih lekovitih supstanci su predviđene pomoću prethodno razvijenog *in silico* modela za predviđanje permeabilnosti. Da bi se identifikovala minimalna rastvorljivost lekovitih supstanci unutar fiziološkog opsega pH vrednosti, izvršen je opsežan pregled raspoložive literature. Za neutralne lekovite supstance je pretpostavljena pH nezavisna rastvorljivost unutar fiziološkog opsega. Konačno, odgovarajuće vrednosti za rastvorljivost lekovitih supstanci su podeljene

vrednošću najveće pojedinačne terapijske doze za datu supstancu da bi se dobio odnos doza/rastvorljivost ( $D/S$ ), koji je, pored permeabilnosti, prepoznat kao jedan od ključnih biofarmaceutskih parametara povezanih sa apsorpcijom lekovite supstance (168, 238, 239). Iz literaturnih izvora su preuzete vrednosti PIK i  $C_{max}$  dobijene u okviru ispitivanja u zdravih ispitanika nakon primene pojedinačne doze leka.

## 4.2. Napredna analiza podataka

Tehnike za naprednu analizu podataka su korištene za:

- (i) razvoj i validaciju modela za predviđanje intestinalne permeabilnosti u ljudi,
- (ii) identifikaciju i grupisanje lekovitih supstanci sa sličnim biofarmaceutskim, fizičko-hemijskim farmakokinetičkim osobinama, kao i za
- (iii) predviđanje uticaja hrane na intestinalnu apsorpciju lekova.

### 4.2.1. Razvoj i validacija modela za predviđanje intestinalne permeabilnosti u ljudi

Lekovite supstance za koje postoje pouzdani podaci o efektivnoj permeabilnosti određeni u okviru *in vivo* studija intestinalne perfuzije u ljudi su korištene za razvoj i validaciju modela za predviđanje intestinalne permeabilnosti lekovitih supstanci na osnovu vrednosti molekulskih deskriptora TPSA, HBD i HB. Molekulski deskriptori su odabrani na osnovu studije Winiwarter i saradnika (240, 241) i njihove vrednosti su preuzete iz *PubChem* baze podataka (242).

U cilju pronalaženja veze između intestinalne permeabilnosti lekovitih supstanci i vrednosti odabranih molekulskih deskriptora korištena je tehnika nerekurzivnih neuronskih mreža treniranih algoritmom povratne propagacije, višeslojni perceptroni. Neuronske mreže su razvijane pomoću softverske platforme RapidMiner Studio Free v.8.2.001 (RapidMiner GmbH, Dortmund, Germany). Za potrebe treninga i validacije veštačkih neuronskih mreža, lekovite supstance su podeljene u tri seta: (i) set za učenje (training set), (ii) set za proveru (test set) i (iii) set za spoljašnju proveru (eksterni set). Svi setovi su kreirani nasumičnom metodom tako da raspodela vrednosti izlazne varijable ( $P_{eff}$ ) bude slična raspodeli u celom setu, koji bi sadržao sve lekovite supstance. Da bi se osiguralo da kreirane neuronske mreže imaju dobru sposobnost generalizacije, desetstruka unakrsna validacija i test set su korišteni za validaciju. U unakrsnoj validaciji, training set je podeljen na deset približno istih delova i model je razvijan na devet delova, dok je preostali deo korišten za procenu greške predviđanja. Ovaj postupak je ponovljen deset puta, tako da je svaki deo jednom korišten za validaciju. Dobijeni modeli su evaluirani i validirani na osnovu vrednosti sledećih statističkih parametara: kvadrat koeficijenta korelacije za unakrsnu validaciju (engl. *Square correlation coefficient of cross validation*,  $Q^2$ ), koren srednjeg kvadratnog odstupanja za unakrsnu validaciju (engl. *Root mean squared error of cross validation*, RMSE<sub>cv</sub>), kvadrat koeficijenta korelacije za test set (engl. *Square correlation coefficient of test set*,  $R^2_T$ ) i koren srednjeg kvadratnog odstupanja za test set (engl. *Root mean squared error for test set*, RMSE<sub>T</sub>) (243). Eksterni set je korišten za praćenje performansi mreža tokom treniranja da bi se sprečilo preterano treniranje mreža.

### 4.2.2. Klasterovanje podataka

Tehnika hijerarhijskog klasterovanja na glavnim komponentama, koja kombinuje analizu glavnih komponenti, hijerarhijsko i nehijerarhijsko klasterovanje, je primenjena na setovima podataka A, B i C. S obzirom na to da se pretpostavlja da poslednje PCA komponente predstavljaju šum koji ometa proces klasterovanja, u narednim koracima su uzete u obzir samo komponente sa svojstvenim

vrednostima (engl. *Eigenvalues*)  $> 0,7$  (Jolliffe modifikacija Kaiser-Guttman metode) (244). Hijerarhijsko klasterovanje je sprovedeno prema Ward-ovom kriterijumu na osnovu procene varijanse (inercija) kao i na osnovu metode glavnih komponenti. Broj klastera u nehijerarhijskom (K-means) klasterovanju je definisan automatski od strane softvera: HCPC algoritam je predložio optimalan broj klastera uzimajući u obzir opšti oblik hijerarhijskog stabla i trakasti grafikon koji predstavlja povećanje varijanse. Analiza je sprovedena pomoću programskog paketa FactoMineR v. 1.34 (245), koji je deo softverske platforme R Studio v.3.5.2. (R Studio, Inc.). Sve ulazne varijable su bile izražene u različitim skalama, te da bi se mogle međusobno porediti sve kolone u setovima podataka su, pre analize, transformisane tako da imaju srednju vrednost 0 i standardnu devijaciju 1 (246).

U slučaju seta podataka A, ulazne varijable za klasterovanje su bile odnos doza/rastvorljivost (D/S), procenat apsorbovanog leka ( $F_a$ ) i permeabilnost ( $P_{eff}$ ). Analizirane su dve kombinacije ulaznih varijabli:

- (I) D/S,  $P_{eff}$ ;
- (II) D/S,  $P_{eff}$ ,  $F_a$ .

Da bi se jasno definisale granične vrednosti biofarmaceutskih parametara između dobijenih klastera, nakon klaster analize sprovedena je klasifikacija primenom algoritma stablo odlučivanja. Kao ulazni parametri za kreiranje stabla odlučivanja su primenjene prethodno navedene biofarmaceutske karakteristike lekovitih supstanci, dok su izlazni parametri bile identifikovane grupe/klasteri. Analiza je sprovedena pomoću rpart funkcije (engl. *Recursive partitioning and regression trees*) sa standardnim postavkama, koja je dostupna u rpart paketu v. 4.1–13 (R Studio v.3.5.2.) (247).

U slučaju setova podataka B i C, HCPC analiza je najpre sprovedena na svakom setu pojedinačno, a zatim na oba seta zajedno (zbirni set podataka). Analizirane su sledeće kombinacije ulaznih varijabli:

- (I) biofarmaceutski (D/S,  $P_{eff}$ ,  $F_a$ ) i farmakokinetički ( $F_m$ , PIK/D,  $C_{max}/D$ ,  $t_{1/2}$ ) parametri;
- (II) biofarmaceutski (D/S,  $P_{eff}$ ,  $F_a$ ) i fizičkohemijski (clogP, TPSA, HB, MW) parametri;
- (III) farmakokinetički ( $F_m$ , PIK/D,  $C_{max}/D$ ,  $t_{1/2}$ ) i fizičkohemijski (clogP, TPSA, HB, MW) parametri, kao i
- (IV) kombinacija svih jedanaest parametara.

Identifikovani klasteri su opisani pomoću *desc.var* izveštaja, koji se kreira tokom izvršenja HCPC algoritma u FactoMineR paketu (245). Ovaj izveštaj omogućava da se kvalitativna varijabla (dobijeni klasteri) opiše sa kvantitativnim varijablama. Za kontinuirane varijable, *desc.var* daje prosečnu vrednost svake varijable u dobijenom klasteru (srednja vrednost u kategoriji), prosečnu vrednost svake varijable u celom setu podataka (sveukupna srednja vrednost), pridruženu standardnu devijaciju, te vrednost v-testa i p-vrednost koja odgovara testu sledeće hipoteze: "srednja vrednost u kategoriji je jednaka sveukupnoj srednjoj vrednosti". Vrednost v-testa veća od 1,96 odgovara p-vrednosti manjoj od 0,05; predznak vrednosti v-testa pokazuje da li je srednja vrednost varijable u klasteru veća ili manja od njene sveukupne tj. srednje vrednosti u celom setu podataka (217). Dakle, v-test se koristi za rangiranje varijabli u skladu sa njegovim uticajem na proces klasterovanja. Nakon klaster analize je sprovedena klasifikacija primenom algoritma stablo odlučivanja. Kao ulazni parametri za kreiranje stabla odlučivanja su primenjene varijable koje su prema rezultatima v-testa najviše uticale na proces klasterovanja, dok su izlazni parametri bile identifikovane grupe/klasteri. Analiza je sprovedena pomoću rpart funkcije (*Recursive partitioning and regression trees*) sa standardnim postavkama, koja je dostupna u rpart paketu v. 4.1–13 (R Studio v.3.5.2.) (247).

### 4.2.3. Razvoj i validacija modela za predviđanje uticaja hrane na intestinalnu apsorpciju lekova

Za razvoj modela za predviđanje efekta hrane je korišten caret paket (R Studio v.3.5.2.) (248). Zbirni set podataka (set B i set C) je podeljen na set za učenje (training set) i set za proveru (test set) pomoću desetostruke unakrsne validacije sa stratifikovanim uzorkovanjem u odnosu 7:3. U metodi stratifikovanog uzorkovanja set podataka se deli na podgrupe na osnovu vrednosti izlazne varijable tj. na ovaj način se kreiraju podsetovi čija distribucija vrednosti izlazne varijable odgovara distribuciji u celom setu podataka. Na training set je primenjena *RandOverClassif* funkcija dostupna u UBL paketu (R Studio v.3.5.2.), koja je omogućila da se veštački utrostruči i učetvorostruči broj primera lekovitih supstanci sa pozitivnim i negativnim efektom hrane, redom (249). Klasifikacioni modeli su kreirani pomoću algoritma slučajnih šuma (RF) i algoritma potpornih vektora sa polinomalnom kernel funkcijom (SVMPoly). Tokom treniranja modela primenjena je desetostruka unakrsna validacija. Klasifikacioni modeli su evaluirani na osnovu vrednosti osetljivosti (engl. *Sensitivity*), preciznosti klasifikacije (engl. *Precision*) i kappa vrednosti, koje su dobijene za test set od 15 lekovitih supstanci. Kappa se odnosi na *Cohen's* kappa statistiku. To je metrika koja poredi dobijenu tačnost sa očekivanom tačnošću pri čemu kappa vrednost od 0 do 0,20 označava “neznatno”, od 0,21 do 0,40 “prilično”, od 0,41 do 0,60 “umereno”, a od 0,61 do 0,80 “značajno” i od 0,81 do 1 “gotovo savršeno” slaganje (250). Značaj svake varijable u procesu klasifikacije je procenjen pomoću *varImp* funkcije u caret paketu. Parametar *useModel* u *varImp* funkciji je podešen na *FALSE* da bi se osigurala primena model nezavisne metrike, koja računa površinu ispod krive (PIK) za svaki par klasa (klasa “bez efekta” (FE0) naspram klase sa “pozitivnim” efektom (FE↑), klasa sa “pozitivnim” efektom (FE↑) naspram klase sa “negativnim” efektom (FE↓) itd.). Za svaku klasu je kao mera značaja ulaznih varijabli za predviđanje pripadnosti lekovitih supstanci toj klasi korištena maksimalna površina ispod krive (PIK) (251). Eksterna evaluacija je izvršena primenom modela na setu podataka A.

### 4.3. Biofarmaceutska karakterizacija lekovitih supstanci koje pokazuju nisku rastvorljivost i nisku permeabilnost

Biofarmaceutska karakterizacija izabranih model supstanci koje pokazuju nisku rastvorljivost i nisku permeabilnost i pripadaju setu podataka C (aciklovir, furosemid, valsartan i norfloksacin) obuhvatila je detaljnu analizu raspoloživih literaturnih *in vivo* i *in vitro* podataka, opsežna *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance iz komercijalno dostupnih preparata različitih proizvođača i *in silico* razvoj fiziološki zasnovanih farmakokinetičkih modela s ciljem identifikacije očekivanih profila koncentracije ispitivanih model supstanci u plazmi.

#### 4.3.1. *In vivo* podaci

U cilju pronalazanja *in vivo* podataka dobijenih za različite doze i farmaceutske oblike aciklovira, furosemida, valsartana i norfloksacina sprovedena je opsežna pretraga naučnih baza *Pubmed* i *Google Scholar*. Za razvoj i validaciju PBPK modela su korišteni *in vivo* profili ispitivanih model supstanci u plazmi dobijeni nakon intravenske primene, kao i oralne primene preparata sa trenutnim oslobađanjem lekovite supstance u preprandijalnim i postprandijalnim uslovima. Detaljnije informacije i pregled literaturnih *in vivo* podataka navedeni su u okviru poglavlja Rezultati i diskusija.

### 4.3.2. *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja

Za ispitivanje brzine rastvaranja izabranih lekovitih supstanci iz komercijalno dostupnih tableta sa trenutnim oslobađanjem korišteni su sledeći medijumi:

- 0,1M HCl (pH 1,2);
- acetatni pufer (pH 4,5);
- fosfatni pufer (pH 6,8);
- “pojednostavljeni” fiziološki zasnovani medijumi koji simuliraju intestinalnu tečnost u preprandijalnim uslovima: a) bez površinski aktivnih supstanci (*FaSSIFb*) i b) sa dodatkom sintetskih površinski aktivnih supstanci (*FaSSIFs*);
- “pojednostavljeni” fiziološki zasnovani medijumi koji simulira intestinalnu tečnost u postprandijalnim uslovima: a) bez površinski aktivnih supstanci (*FeSSIFb*) i b) sa dodatkom sintetskih površinski aktivnih supstanci (*FeSSIFs*).

Za pripremu medijuma korišteni su: natrijum-hidroksid (Lach-Ner, Češka), natrijum-dihydrogenfosfat-dihidrat (Analytika Ltd., Češka), natrijum-hlorid (Lach-Ner, Češka), glacijalna sirćetna kiselina (Lach-Ner, Češka), koncentrovana hlorovodonična kiselina (Lach-Ner, Češka), natrijum-laurilsulfat (Lach-Ner, Češka), polisorbata 80 (Tween<sup>®</sup> 80, Thermo Fisher Scientific, SAD), kalijum-hlorid (Lach-Ner, Češka), natrijum-acetat (Lach-Ner, Češka), kalijum-dihydrogenfosfat (Lach-Ner, Češka). Sve supstance se bile odgovarajućeg stepena čistoće (p.a) Acetatni pufer pH 4,5, fosfatni pufer pH 6,8 i 0,1M HCl (pH 1,2) su pripremljeni prema propisima USP 41 (252), dok je sastav ostalih medijuma prikazan u Tabeli 1.

Tabela 1. Sastav primenjenih “pojednostavljenih” fiziološki zasnovanih medijuma\*

Vrsta medijuma	Sastav medijuma
<i>FaSSIFb</i>	0,348 g NaOH, 4,4707 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 6,186 g NaCl, prečišćena voda do 1 l. Po potrebi, podešavanje pH vrednosti na 6,5 je izvršeno 0,1 M rastvorom NaOH ili HCl.
<i>FeSSIFb</i>	4,04 g NaOH, 8,65 g glacijalna CH <sub>3</sub> COOH, 11,874 g NaCl, prečišćena voda do 1 l. Po potrebi, podešavanje pH vrednosti na 5 je izvršeno 0,1 M rastvorom NaOH ili HCl.
<i>FaSSIFs</i> **	dodatak 0,05% natrijum-laurilsulfata (NaLS) ili polisorbata 80 u <i>FaSSIFb</i>
<i>FeSSIFs</i> **	dodatak 0,1% natrijum-laurilsulfata (NaLS) ili polisorbata 80 u <i>FeSSIFb</i>

\*Prema (253) i (254); \*\*Nakon dodatka NaLS ili polisorbata 80 medijumi su, s ciljem homogenizacije, stavljeni na ultrazvučno kupatilo u toku 15 minuta, a potom na magnetnu mešalicu, takođe, u toku 15 minuta.

Ispitivanje brzine rastvaranja lekovitih susptanci iz tableta je sprovedeno u aparaturi sa lopaticom (*Erweka DT 720*) pri brzini od 75 obrtaja/min na temperaturi  $37 \pm 0,5$  °C. Zapremina medijuma pH 1,2, pH 4,5 i pH 6,8 je bila 500 ml (17). U slučaju medijuma *FaSSIFb* i *FaSSIFs* zapremina je takođe bila 500 ml u skladu sa preporukama za simulaciju preprandijalnih uslova, dok je za *FeSSIFb* i *FeSSIFs* primenjena zapremina od 1000 ml prema preporukama za simulaciju postprandijalnih uslova u proksimalnom tankom crevu (254, 255).

Ispitivanje je sprovedeno sa po tri tablete. Po 5 ml uzorka medijuma je uzimano nakon 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 i 120 min uz nadoknadu medijuma posle svakog uzorkovanja. Sadržaj lekovitih supstanci u uzorcima, nakon filtriranja (0,22 µm membranski filter Chromafil<sup>®</sup> Xtra PTFE-20/25, Macherey-Nagel, Düren, Nemačka), je određen spektrofotometrijski (dvokanalni Shimadzu UV-VIS spektrofotometar, model 1800) na talasnim dužinama maksimuma apsorpcije. Najpre su

konstruisane kalibracione krive merenjem apsorbancije serije rastvora poznatih koncentracija, a zatim je iz jednačine kalibracione krive i izmerenih apsorbancija uzoraka izračunata koncentracija lekovitih supstanci u uzorcima.

Za poređenje dobijenih profila brzine rastvaranja lekovitih supstanci iz tableta je korišten faktor sličnosti ( $f_2$ ) (17). Ukoliko je  $f_2$  vrednost veća ili jednaka 50, dva profila brzine rastvaranja se smatraju statistički sličnim (17).

### 4.3.3. Ispitivani preparati

U ispitivanju su korišteni uzorci komercijalno dostupnih tableta sa trenutnim oslobađanjem aciklovira jačine 200 mg (A1 i A2), furosemida jačine 40 mg (F1 i F2), valsartana jačine 160 mg (V1 i V2) i norfloksacina jačine 400 mg (N1 i N2). Kvalitativni sastav ispitivanih preparata različitih proizvođača prikazan je u okviru poglavlja Rezultati i diskusija.

### 4.3.4. Razvoj fiziološki zasnovanih farmakokinetičkih modela

Programski paket GastroPlus™ (verzija 9,7, SimulationsPlus, SAD) je korišćen za razvoj i validaciju *in silico* modela za predviđanje apsorpcije odabranih lekovitih supstanci (aciklovir, furosemid, valsartan i norfloksacin) nakon oralne primene različitih preparata i za procenu uticaja brzine rastvaranja lekovitih supstanci iz tableta sa trenutnim oslobađanjem na njihovu apsorpciju posle primene na gladno, odnosno nakon uzimanja obroka.

Kao ulazni parametri za razvoj modela su korišteni podaci o fizičko-hemijskim i farmakokinetičkim karakteristikama lekovitih supstanci, kao i eksperimentalno određeni profili brzine rastvaranja lekovitih supstanci iz ispitivanih preparata u različitim medijumima, u kombinaciji sa fiziološkim parametrima koji odgovaraju uslovima na gladno, kao i u prisustvu hrane.

U cilju pronalaženja potrebnih fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih parametara sprovedena je ospežna pretraga dostupne literature. Za očitavanje podataka sa grafičkih prikaza iz literature je korišten WebPlotDigitizer (verzija 4.4, Ankit Rohatgi, SAD). Parametri, za koje nisu dostupne literaturne vrednosti, su predviđeni *in silico* ili su korištene preporučene (*default*) GastroPlus™ vrednosti. Pojedini farmakokinetički parametri su izračunati pomoću PKPlus™ modula u GastroPlus™ na osnovu *in vivo* profila koncentracije lekovite supstance u plazmi. Kada su kao ulazni parametri korišćeni eksperimentalno određeni profili brzine rastvaranja lekovitih supstanci iz ispitivanih preparata u *FaSSIFb*, *FaSSIFs* i rastvorima pufera pH 1,2, 4,5 i pH 6,8, koji odgovaraju pH vrednostima u želucu, gornjem delu tankog creva i srednjem delu tankog creva, redom (255), fiziološki uslovi u modelu su podešeni tako da odgovaraju *in vivo* uslovima na gladno. Sa druge strane, kada su kao ulazni parametri primenjeni eksperimentalno određeni profili brzine rastvaranja lekovitih supstanci iz ispitivanih preparata u *FeSSIFb* i *FeSSIFs*, fiziološki uslovi su podešeni da odgovaraju uslovima u prisustvu hrane.

Razvijeni PBPK modeli su validirani poređenjem simuliranih profila sa *in vivo* profilima koncentracija lekovite supstance u plazmi nakon intravenske (i.v.) i oralne primene. Poređenje simuliranih sa *in vivo* profilima nakon i.v. primene omogućava procenu validnosti izabranih vrednosti ulaznih parametara koji opisuju distribuciju i eliminaciju leka, a naknadno poređenje simuliranih sa *in vivo* profilima nakon oralne primene omogućava procenu validnosti vrednosti ulaznih parametara koji utiču na apsorpciju lekovite supstance.

Dobijeni farmakokinetički parametri ( $PK_{0-\infty}$ ,  $t_{max}$  i  $C_{max}$ ) za simulirane profile koncentracije aciklovira, furosemida, valsartana, i norfloksacina u plazmi na gladno i u prisustvu hrane su upoređeni sa odgovarajućim *in vivo* vrednostima izračunavanjem greške predviđanja (engl. *fold-error*) (jednačina 8). Predviđene vrednosti farmakokinetičkih parametara se mogu smatrati



zadovoljavajućim ukoliko se nalaze u opsegu dvostrukog odstupanja od vrednosti *in vivo* određenih parametara tj. ukoliko je greška predviđanja od 0,5 do 2 (256).

$$\text{Greška predviđanja} = \frac{\text{predviđena (in silico)vrednost}}{\text{uočena (in vivo)vrednost}} \quad [\text{jednačina 8}]$$

Korelacija između predviđenih i *in vivo* uočenih vrednosti farmakokinetičkih parametara je ispitana grafički pri čemu su *in vivo* uočene vrednosti nanese na x osu, dok su na y osu nanese predviđene vrednosti farmakokinetičkih parametara. Vrednosti na osama koordinatnog sistema su prikazane u logaritamskoj skali i na graficima su konstruisane linije koje se odnose na dvostruku grešku predviđanja u odnosu na *in vivo* uočene vrednosti farmakokinetičkih parametara. Takođe, izračunat je i koeficijent determinacije ( $R^2$ ) da bi se kvantifikovala zavisnost između predviđenih i *in vivo* uočenih vrednosti farmakokinetičkih parametara.

Predviđene vrednosti za bioraspoloživost lekovitih supstanci su takođe upoređene sa literaturnim podacima, a primenom razvijenih i validiranih PBPK modela identifikovani su i *in vivo* profili brzine rastvaranja lekovitih supstanci iz tableta u preprandijalnim i postprandijalnim uslovima, kao i profili apsorpcije lekovitih supstanci u različitim regionima GIT-a.

Za procenu *in silico* predviđenog i *in vivo* uočenog efekta hrane na apsorpciju ispitivanih lekovitih supstanci je korišten odnos  $PIK_{0-\infty}$  vrednosti u postprandijalnom i preprandijalnom stanju pri čemu je efekat hrane okarakterisan kao; (i) pozitivan:  $PIK_{0-\infty}$  vrednost u postprandijalnom stanju/ $PIK_{0-\infty}$  vrednost u preprandijalnom stanju veća od 1,2; (ii) bez efekta:  $PIK_{0-\infty}$  vrednost u postprandijalnom stanju/ $PIK_{0-\infty}$  vrednost u preprandijalnom stanju u interval od 0,8 do 1,2 i (iii) negativan:  $PIK_{0-\infty}$  vrednost u postprandijalnom stanju/ $PIK_{0-\infty}$  vrednost u preprandijalnom stanju manja od 0,8 (257).



## 5. REZULTATI I DISKUSIJA

### 5.1. Baza podataka

#### 5.1.1. Set podataka A

Set podataka A sadržao je 75 lekovitih supstanci sa različitim fizičko-hemijskim i biofarmaceutskim osobinama:

- a) broj 1-34 su lekovite supstance za koje postoje pouzdani podaci o efektivnoj permeabilnosti određeni u okviru *in vivo* studija intestinalne perfuzije kod ljudi i preuzete su iz seta koji su objavili Dahlgren i saradnici (16);
- b) broj 35-64 su lekovite supstance za koje je dostupna FIP Biowaiver monografija sa detaljnim pregledom podataka o odgovarajućim fizičko-hemijskim i biofarmaceutskim osobinama (258);
- c) broj 65-72 predstavljaju lekovite supstance za koje postoje pouzdani podaci o efektivnoj permeabilnosti određeni u okviru *in vivo* studija intestinalne perfuzije kod ljudi i preuzete su iz seta koji su objavili Dahlgren i saradnici (16), ali su isključene iz klaster analize seta podataka A zbog visoke molekulske mase (ciklosporin A) ili zbog nedostatka informacija o neophodnim biofarmaceutskim karakteristikama potrebnim za analizu (sulforafan, kvercetin, inogatran, fenoksimetil-penicilin, izotretinoin, urea i kreatinin).
- d) broj 73-75 predstavljaju lekovite supstance za koje su dostupne FIP Biowaiver monografije, ali su isključene iz klaster analize seta podataka A zbog visokih vrednosti molekulskih deskriptora o čemu je detaljno diskutovano u poglavlju 5.2.1.

Osnovne karakteristike ispitivanih lekovitih supstanci prikazane su u Tabeli 2.

#### 5.1.2. Set podataka B

Set podataka B sadrži 27 lekovitih supstanci za koje je u okviru *in vivo* studija pokazana biološka ekvivalentnost između oralno primenjenog rastvora i čvrstog farmaceutskog oblika, uz pretpostavku da farmaceutski oblik leka ne utiče na apsorpciju tj. da apsorpcija lekovite supstance generalno nije "problematična". Osnovne karakteristike ispitivanih lekovitih supstanci prikazane su u Tabeli 3.

Dronabinol i triflusal su jedine supstance iz seta podataka B, koje bi po BCS kriterijumima bile okarakterisane kao nisko rastvorljive. Uvidom u sastav oralnih rastvora primenjenih u *in vivo* studijama bioekvivalencije, koji je dat u sažetku karakteristika leka, utvrđeno je da su 24 od 27 formulacija, uključujući i rastvore dronabinola i triflusala, sadržale korastvarač (etanol, sorbitol, glicerol, ksilitol ili propilenglikol) koji može da utiče na rastvorljivost lekovitih supstanci. U sastavu odgovarajućih čvrstih farmaceutskih oblika, nisu prisutne pomoćne materije koje bi mogle da utiču na rastvorljivost lekovitih supstanci.

#### 5.1.3. Set podataka C

U set podataka C je uključeno 26 lekovitih supstanci za koje se u literaturi navodi da pokazuju nisku rastvorljivost i nisku permeabilnost. Osnovne karakteristike ispitivanih lekovitih supstanci prikazane su u Tabeli 4.

Tabela 2. Set podataka A – pregled i karakteristike ispitivanih lekovitih supstanci

	lekovita supstanca	D/S <sup>a</sup>	P <sub>eff</sub> (x10 <sup>-4</sup> cm/s)	Fa (%) <sup>b</sup>	TPSA	HBD	HB
1	karbamazepin	781,25 <sup>(171)</sup>	4,3	100	46,3	1	2
2	fluvastatin-natrijum	2,67 <sup>(259)</sup>	2,4	100	85,5	2	7
3	L-dopa	151,52 <sup>(260)</sup>	3,4	100	104	4	9
4	naproksen	71428,57 <sup>(261)</sup>	8,5	100	46,5	1	4
5	piroksikam	909,09 <sup>(262)</sup>	6,7	100	108	2	8
6	amjodaron	555,55 <sup>(263)</sup>	0,9	100	42,7	0	4
7	antipirin	9,69 <sup>(263)</sup>	5,7	99	23,6	0	2
8	griseofulvin	33333,33 <sup>(261)</sup>	6,3	99	71,1	0	6
9	dezipramin	2500 <sup>(263)</sup>	4,5	98	15,3	1	3
10	cefaleksin	279,33 <sup>(263)</sup>	1,6	96	158	4	11
11	metoprolol	5,92 <sup>(264)</sup>	1,3	96	50,7	2	6
12	ketoprofen	576,92 <sup>(162)</sup>	8,7	95	54,4	1	4
13	propranolol	0,62 <sup>(265)</sup>	2,9	95	41,5	2	5
14	verapamil-hidrohlorid	10,91 <sup>(266)</sup>	6,8	95	64	1	7
15	oksprenolol	1,26 <sup>(263)</sup>	2,5	95	50,7	2	6
16	amoksicilin	140,85 <sup>(267)</sup>	0,3	92	158	4	11
17	amilorid	1 <sup>(268)</sup>	1,6	90	159	4	9
18	valaciklovir	5,75 <sup>(269)</sup>	1,7	90	147	3	9
19	losartan	250 <sup>(270)</sup>	1,15	80	92,5	2	7
20	digoksin	217,39 <sup>(261)</sup>	0,3	78	203	6	20
21	cimetidin	133,33 <sup>(69)</sup>	0,3	75	114	3	7
22	hidrohlortiazid	182,48 <sup>(261)</sup>	0,04	68	135	3	10
23	enalapril-maleat	4 <sup>(271)</sup>	1,6	67	171	4	14
24	talinolol	93,98 <sup>(272)</sup>	0,3	65	82,6	4	8
25	terbutalin	0,02 <sup>(171)</sup>	0,3	63	72,7	4	8
26	furosemid	3333,33 <sup>(273)</sup>	0,2	61	131	3	10
27	ranitidin	0,1 <sup>(274)</sup>	0,3	57	112	2	9
28	metformin-hidrohlorid	1,67 <sup>(275)</sup>	0,35	54	91,5	3	4
29	α-metildopa	25 <sup>(276)</sup>	0,1	50	104	4	9
30	atenolol	4,03 <sup>(266)</sup>	0,2	50	84,6	3	7
31	lizinopril	0,22 <sup>(277)</sup>	0,3	27	133	4	11
32	enalaprilat	2,29 <sup>(233)</sup>	0,2	10	107	3	9
33	feksofenadin	119,21 <sup>(233)</sup>	0,11	10	81	3	8
34	paracetamol	21,09 <sup>(278)</sup>	4	85	49,3	2	4
35	acetazolamid	625 <sup>(279)</sup>	1,39	100	152	2	9
36	hlorokvin-fosfat	3 <sup>(156)</sup>	3,98	100	28,2	1	4
37	diklofenak-natrijum	41666,67 <sup>(280)</sup>	3,73	100	52,2	1	4
38	levetiracetam	7,21 <sup>(281)</sup>	3,76	100	63,4	1	3
39	levofloksacin	3,75 <sup>(282)</sup>	2,82	100	73,3	1	9
40	pirazinamid	23,15 <sup>(283)</sup>	3,56	100	68,9	1	4
41	stavudin	0,53 <sup>(284)</sup>	2,37	100	78,9	2	6

42	amitriptilin-hidrohlorid	0,15 <sup>(285)</sup>	4,53	95	3,2	1	2
43	kodein-fosfat	0,5 <sup>(286)</sup>	0,34	95	120	4	12
44	metronidazole	43,1 <sup>(287)</sup>	3,26	95	83,9	1	5
45	prednizon	312,5 <sup>(261)</sup>	2,13	95	91,7	2	7
46	flukonazol	28,94 <sup>(288)</sup>	2,87	94	81,6	1	8
47	metoklopramid-hidrohlorid	236,41 <sup>(289)</sup>	1,64	88	67,6	3	7
48	lamivudin	1,92 <sup>(284)</sup>	2,06	86	113	2	6
49	acetilsalicilna kiselina	63,29 <sup>(290)</sup>	3,47	85	63,6	1	5
50	kinin	230,77 <sup>(291)</sup>	3,66	95	45,6	1	5
51	ribavirin	4,23 <sup>(292)</sup>	0,29	85	144	4	11
52	hinidin-sulfat	88,49 <sup>(293)</sup>	3,66	90	45,6	1	5
53	etambutol-dihidrohlorid	0,71 <sup>(294)</sup>	0,01	80	64,5	6	10
54	meflokvin-hidrohlorid	606,79 <sup>(295)</sup>	1,29	78	45,2	3	12
55	amodiakvin-hidrohlorid	63,09 <sup>(296)</sup>	0,1	70	52,8	6	12
56	prednizolon	205,76 <sup>(297)</sup>	1,92	99	101	2	8
57	ibuprofen	21052,63 <sup>(298)</sup>	4,03	98	37,3	1	3
58	zidovudin	16,09 <sup>(284)</sup>	1,99	97	93,2	2	8
59	bisoprolol-fumarat	0,013 <sup>(299)</sup>	0,21	96	135	4	13
60	nifedipin	1724,14 <sup>(300)</sup>	2,59	90	110	1	8
61	izoniazid	1,96 <sup>(301)</sup>	2,61	90	68	2	5
62	ciprofloksacin-hidrohlorid	4411,76 <sup>(302)</sup>	1,28	69	72,9	3	10
63	aciklovir	333,33 <sup>(303)</sup>	0,90	23	115	3	7
64	efavirenc	67415,73 <sup>(304)</sup>	3,59	66	38,3	1	6
65	<i>ciklosporin A</i>	/	1,6	33	279	5	17
66	<i>sulforafan</i>	/	18,7	/	80,7	0	4
67	<i>kvercetin</i>	/	8,9	/	286	11	28
68	<i>inogatran</i>	/	0,03	/	163	5	11
69	<i>fenoksimeti -penicilin</i>	/	0,06	/	121	2	8
70	<i>izotretinoin</i>	/	1	/	37,3	1	3
71	<i>urea</i>	/	1,4	/	69,1	2	3
72	<i>kreatinin</i>	/	0,3	/	58,7	1	1
73	<i>rifampicin</i>	/	/	80	220	6	21
74	<i>primakvin-fosfat</i>	/	/	/	216	8	20
75	<i>doksiciklin- hiklat</i>	/	/	100	385	16	36

<sup>a</sup> Doze su preuzete iz FDA Orange Book (305); <sup>b</sup> Relevantne vrednosti su preuzete iz studija Lennernäs i saradnika (306), Larregieu i saradnika (307) i Newby i saradnika (237), kao i dostupnih FIP *Biowaiver* Monografija (258).

Tabela 3. Set podataka B – pregled i karakteristike ispitivanih lekovitih supstanci

lekovita supstanca	MW	clogP	HB	TPSA	D/S	Fa <sup>a</sup> (%)	P <sup>eff</sup> (x 10 <sup>-4</sup> cm/s)	Fm (%)	t <sub>1/2</sub> (h)	PIK/D (x 10 <sup>-5</sup> h/ml)	C <sub>max</sub> /D (x 10 <sup>-5</sup> 1/ml)
amlodipin	408,9	3,43	9	99,9	50 <sup>(308)</sup>	95	1,82	90 <sup>(226)</sup>	36 <sup>(309)</sup>	1,9 <sup>(309)</sup>	0,05 <sup>(309)</sup>
atomoksetin	255,4	3,94	3	21,3	3,2 <sup>(310)</sup>	100	3,21	80 <sup>(311)</sup>	5,6 <sup>(312)</sup>	6,1 <sup>(312)</sup>	0,90 <sup>(312)</sup>
benazepril	424,5	1,82	8	95,9	3,6 <sup>(313)</sup>	50	1,21	96 <sup>(314)</sup>	0,6 <sup>(315)</sup>	1,1 <sup>(315)</sup>	1,10 <sup>(315)</sup>
brivaracetam	212,3	1,01	3	63,4	0,1 <sup>(316)</sup>	100	3,76	90 <sup>(239)</sup>	9,1 <sup>(317)</sup>	30,2 <sup>(317)</sup>	2,68 <sup>(317)</sup>
kalcitriol	416,7	6,04	6	60,7	0,2 <sup>(318)</sup>	100	1,81	65 <sup>(240)</sup>	5,9 <sup>(319)</sup>	12,3 <sup>(319)</sup>	2,50 <sup>(319)</sup>
kaptopril	217,3	0,89	6	58,6	0,6 <sup>(320)</sup>	84	2,57	40 <sup>(321)</sup>	2,2 <sup>(321)</sup>	1,2 <sup>(321)</sup>	0,80 <sup>(321)</sup>
citalopram	324,4	3,13	4	36,3	0,6 <sup>(318)</sup>	100	4,74	75 <sup>(322)</sup>	34 <sup>(323)</sup>	4,8 <sup>(323)</sup>	0,13 <sup>(323)</sup>
klonazepam	315,7	2,38	5	87,3	20 <sup>(171)</sup>	100	3,23	98 <sup>(324)</sup>	38 <sup>(325)</sup>	21,5 <sup>(325)</sup>	0,64 <sup>(325)</sup>
desloratadin	310,8	3,83	3	24,9	227 <sup>(326)</sup>	100	4,16	91 <sup>(241)</sup>	27 <sup>(327)</sup>	1,1 <sup>(327)</sup>	0,08 <sup>(327)</sup>
donepezil-hidrochlorid	415,9	4,6	5	38,8	1 <sup>(328)</sup>	100	3,73	55 <sup>(329)</sup>	78 <sup>(329)</sup>	4,1 <sup>(329)</sup>	0,15 <sup>(329)</sup>
dronabinol	314,5	7,94	3	29,5	3571 <sup>(330)</sup>	95	4,11	94 <sup>(331, 332)</sup>	3,5 <sup>(333)</sup>	0,1 <sup>(333)</sup>	0,06 <sup>(333)</sup>
fluoksetin-hidrochlorid	309,3	4,57	7	21,3	1,4 <sup>(233)</sup>	88	2,80	74 <sup>(334)</sup>	22 <sup>(335)</sup>	1,7 <sup>(335)</sup>	0,07 <sup>(335)</sup>
lakosamid	250,3	0,39	5	67,4	6,7 <sup>(336)</sup>	100	2,61	53 <sup>(337)</sup>	13 <sup>(338)</sup>	42,3 <sup>(338)</sup>	2,63 <sup>(338)</sup>
levetiracetam	170,2	-0,34	3	63,4	0,7 <sup>(174)</sup>	100	3,76	24 <sup>(210)</sup>	7,4 <sup>(293)</sup>	27,3 <sup>(293)</sup>	2,71 <sup>(293)</sup>
levotiroksin-natrijum	776,9	3,51	7	95,6	4,7 <sup>(339)</sup>	80	2,09	80 <sup>(211)</sup>	180 <sup>(340)</sup>	2152 <sup>(340)</sup>	50,5 <sup>(340)</sup>
lizinopril	405,5	-1,69	11	133	0,1 <sup>(341)</sup>	27	0,34	0 <sup>(342)</sup>	21 <sup>(342)</sup>	3,5 <sup>(342)</sup>	0,31 <sup>(342)</sup>
loperamid-hidrochlorid	513,5	4,66	5	43,8	4 <sup>(318)</sup>	76	3,82	70 <sup>(343)</sup>	14 <sup>(297)</sup>	0,4 <sup>(297)</sup>	0,02 <sup>(297)</sup>
metformin-hidrochlorid	129,2	-1,43	4	91,5	1,7 <sup>(320)</sup>	54	1,05	0 <sup>(344)</sup>	6 <sup>(345)</sup>	1,3 <sup>(345)</sup>	0,20 <sup>(345)</sup>
nikardipin	479,5	5,23	9	114	20 <sup>(346)</sup>	95	2,42	99 <sup>(347)</sup>	2,1 <sup>(347)</sup>	0,5 <sup>(347)</sup>	0,17 <sup>(347)</sup>
nizatidin	331,5	-0,16	10	140	7 <sup>(330)</sup>	95	1,38	30 <sup>(324)</sup>	1,4 <sup>(348)</sup>	2,4 <sup>(348)</sup>	0,91 <sup>(348)</sup>
paroksetin	329,4	4,24	6	39,7	4,8 <sup>(349)</sup>	100	3,58	98 <sup>(350)</sup>	16 <sup>(351)</sup>	0,6 <sup>(351)</sup>	0,09 <sup>(351)</sup>

pregabalin	159,2	-0,92	5	63,3	9,3 <sup>(182)</sup>	90	2,65	2 <sup>(352)</sup>	5,6 <sup>(353)</sup>	22,1 <sup>(353)</sup>	3,15 <sup>(353)</sup>
ramirpil	416,5	1,54	8	95,9	0,3 <sup>(318)</sup>	60	1,97	98 <sup>(324)</sup>	14 <sup>(354)</sup>	0,4 <sup>(354)</sup>	0,24 <sup>(354)</sup>
ranitidin	314,4	0,67	9	112	0,3 <sup>(274)</sup>	57	1	30 <sup>(324)</sup>	2,9 <sup>(355)</sup>	1,7 <sup>(355)</sup>	0,30 <sup>(355)</sup>
risperidon	410,5	2,71	6	61,9	25 <sup>(330)</sup>	97	4,20	99 <sup>(356)</sup>	3,6 <sup>(357)</sup>	4,5 <sup>(357)</sup>	0,90 <sup>(357)</sup>
terbutalin	225,3	0,48	8	72,7	0,1 <sup>(358)</sup>	63	0,91	30 <sup>(324)</sup>	14 <sup>(359)</sup>	4,2 <sup>(359)</sup>	0,04 <sup>(359)</sup>
triflusal	248,2	2,06	8	63,6	900 <sup>(360)</sup>	100	3,05	60 <sup>(361)</sup>	0,5 <sup>(362)</sup>	2,3 <sup>(362)</sup>	1,29 <sup>(362)</sup>

<sup>a</sup> Podaci o procentu apsorbovanog leka (Fa) su preuzeti iz setova podataka koje su publikovali Newby i saradnici (237) i Pham-The i saradnici (233)

Tabela 4. Set podataka C – pregled i karakteristike ispitivanih lekovitih supstanci

lekovita supstanca	MW	clogP	HB	TPSA	D/S	Fa (%) <sup>a</sup>	P <sup>eff</sup> (x 10 <sup>-4</sup> cm/s)	Fm (%)	t <sub>1/2</sub> (h)	PIK/D (x 10 <sup>-5</sup> h/ml)	C <sub>max</sub> /D (x 10 <sup>-5</sup> 1/ml)	kiselo/bazne osobine*
acetazolamid	222,2	-0,98	9	115,1	352 <sup>(330)</sup>	100	1,69	1 <sup>(363)</sup>	6 <sup>(364)</sup>	37,6 <sup>(364)</sup>	4 <sup>(364)</sup>	k
aciklovir	225,2	-2,42	7	114,8	333,3 <sup>(303)</sup>	23	0,90	14 <sup>(324)</sup>	2,9 <sup>(365)</sup>	0,7 <sup>(365)</sup>	0,16 <sup>(365)</sup>	a
amisulprid	369,5	1,80	9	101,7	370 <sup>(233)</sup>	100	1,80	5 <sup>(366)</sup>	12 <sup>(366)</sup>	1,2 <sup>(366)</sup>	0,11 <sup>(366)</sup>	b
atovakvon	366,9	6,35	4	54,37	5x10 <sup>6</sup> <sup>(367)</sup>	6	3,71	0 <sup>(368)</sup>	63 <sup>(369)</sup>	18,8 <sup>(370)</sup>	0,16 <sup>(370)</sup>	k
azapropazon	300,4	1,79	6	56,22	2222 <sup>(371)</sup>	90	4,26	22 <sup>(371)</sup>	14 <sup>(371)</sup>	306 <sup>(371)</sup>	14,7 <sup>(371)</sup>	a
kandesartan-cileksetil	610,7	7,08	13	143,3	640 <sup>(171)</sup>	40	1,68	0 <sup>(223)</sup>	9,5 <sup>(223)</sup>	8,8 <sup>(223)</sup>	0,88 <sup>(223)</sup>	a
cefprozil	389,4	-1,87	12	133	9091 <sup>(180)</sup>	95	0,28	20 <sup>(372)</sup>	1,3 <sup>(372)</sup>	6,6 <sup>(372)</sup>	2 <sup>(372)</sup>	b
ceftibuten	410,4	-1,21	14	162,9	5000 <sup>(308)</sup>	70	0,04	5 <sup>(373)</sup>	2,4 <sup>(300)</sup>	18,4 <sup>(300)</sup>	3,75 <sup>(300)</sup>	a
hlortiazid	295,7	-0,29	9	118,7	1786 <sup>(330)</sup>	60	1,66	0 <sup>(374)</sup>	2 <sup>(374)</sup>	0,9 <sup>(374)</sup>	0,26 <sup>(374)</sup>	a
hlortalidon	338,8	0,45	9	109,5	833 <sup>(330)</sup>	65	1,11	30 <sup>(324)</sup>	49 <sup>(375)</sup>	566 <sup>(375)</sup>	5,55 <sup>(375)</sup>	k
ciprofloksacin--hidrohlorid	331,4	-0,73	10	72,9	7500 <sup>(330)</sup>	69	1,28	15 <sup>(212)</sup>	4 <sup>(212)</sup>	2,7 <sup>(212)</sup>	0,57 <sup>(212)</sup>	a
klodronska kiselina	244,9	-0,14	10	115,1	2025 <sup>(360)</sup>	3	0,50	0 <sup>(376)</sup>	2,6 <sup>(376)</sup>	0,3 <sup>(376)</sup>	0,09 <sup>(376)</sup>	k
enoksacin	320,3	-1,60	9	85,8	149 <sup>(233)</sup>	89	1,94	30 <sup>(324)</sup>	5,2 <sup>(377)</sup>	4,03 <sup>(377)</sup>	0,69 <sup>(377)</sup>	a
eprosartan--mezilat	424,5	4,80	12	183	130 <sup>(378)</sup>	15	0,43	20 <sup>(247)</sup>	20 <sup>(379)</sup>	2,6 <sup>(380)</sup>	0,57 <sup>(380)</sup>	a
felbamat	238,3	0,50	8	104,6	857 <sup>(171)</sup>	90	1,89	50 <sup>(381)</sup>	19 <sup>(382)</sup>	34,3 <sup>(378)</sup>	1,48 <sup>(382)</sup>	k
fleroksacin	369,4	-0,33	7	64,1	1158 <sup>(383)</sup>	100	3,19	20 <sup>(384)</sup>	10 <sup>(384)</sup>	13,3 <sup>(384)</sup>	0,88 <sup>(384)</sup>	a
furosemid	330,8	1,90	10	131	3333 <sup>(273)</sup>	61	0,20	10 <sup>(385)</sup>	1,9 <sup>(386)</sup>	10,4 <sup>(386)</sup>	4,43 <sup>(386)</sup>	k
lenalidomid	259,3	-0,41	8	92,5	56 <sup>(188)</sup>	90	2,00	5 <sup>(387)</sup>	2,8 <sup>(387)</sup>	5,5 <sup>(387)</sup>	1,56 <sup>(387)</sup>	b

<b>megestrol- acetat</b>	384,5	3,77	4	60,4	2x10 <sup>4</sup> (388)	100	4,50	8 <sup>(389)</sup>	33 <sup>(390)</sup>	1,1 <sup>(390)</sup>	0,03 <sup>(390)</sup>	n
<b>nitrofurantoin</b>	238,2	-0,47	10	120,7	368 <sup>(330)</sup>	95	2,23	50 <sup>(324)</sup>	0,8 <sup>(391)</sup>	2,2 <sup>(391)</sup>	0,88 <sup>(391)</sup>	k
<b>norfloksacin</b>	319,3	-0,78	9	72,9	533 <sup>(392)</sup>	75	2,00	10 <sup>(393)</sup>	3,5 <sup>(269)</sup>	1,6 <sup>(269)</sup>	0,38 <sup>(269)</sup>	a
<b>fenoksimetil- penicilin</b>	350,4	1,94	9	95,9	1600 <sup>(394)</sup>	60	1,85	10 <sup>(385)</sup>	0,5 <sup>(395)</sup>	1,7 <sup>(395)</sup>	3,04 <sup>(395)</sup>	k
<b>fenazopiridin- hidrochlorid</b>	213,2	2,32	7	89,7	364 <sup>(396)</sup>	90	2,15	49 <sup>(324)</sup>	9,6 <sup>(397)</sup>	0,2 <sup>(397)</sup>	0,03 <sup>(397)</sup>	b
<b>sulfisoksazol</b>	267,3	1,03	8	107	1515 <sup>(233)</sup>	95	1,87	30 <sup>(324)</sup>	4,2 <sup>(398)</sup>	43,7 <sup>(398)</sup>	5,59 <sup>(398)</sup>	k
<b>valsartan</b>	435,5	4,86	10	112,1	3200 <sup>(330)</sup>	55	1,60	4 <sup>(248)</sup>	6 <sup>(399)</sup>	12,8 <sup>(248)</sup>	1,93 <sup>(248)</sup>	k
<b>riboflavin</b>	376,4	-0,73	12	155	667 <sup>(330)</sup>	80	0,10	25 <sup>(324)</sup>	3 <sup>(400)</sup>	0,07 <sup>(400)</sup>	0,01 <sup>(400)</sup>	n

<sup>a</sup> Podaci o procentu apsorbovanog leka (Fa) su preuzeti iz setova podataka koje su publikovali Newby i saradnici (237) i Pham-The i saradnici (233) ili iz drugih izvora (azapropazon (371), kandesartan-cileksetil, fenoksimetil-penicilin (307) i hlortalidon (401)), \*k-kiselina, b-baza, n-neutralno, a-amfolit

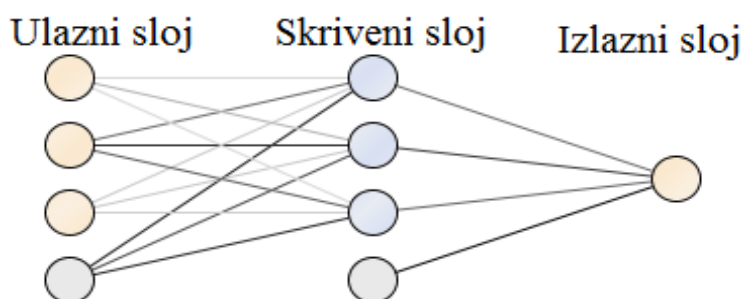


Iako je osnovni kriterijum za uključivanje lekovitih supstanci u set C bila niska rastvorljivost i niska permeabilnost za koje se očekuje da dovode do ograničene apsorpcije i, sledstveno, biološke raspoloživosti, čak 12 od 26 izabranih lekovitih supstanci su pokazivale visok stepen apsorpcije ( $F_a > 85\%$ ). Ovo se može objasniti konzervativnim pristupom u biofarmaceutskoj karakterizaciji lekovitih supstanci u kojem se rastvorljivost definiše na osnovu teorijskih, deskriptivnih vrednosti pri čemu se u obzir uzimaju minimalne vrednosti rastvorljivosti, te se na taj način uglavnom klasifikuju kao nisko rastvorljive lekovite supstance. Sa druge strane klasifikacija permeabilnosti je obično zasnovana na logP vrednostima ili permeabilnosti određenoj na kulturama ćelija. Međutim, između podataka o permeabilnosti određenoj na kulturama ćelijama postoje velike interlaboratorijske razlike, te se klasifikacija permeabilnosti lekovite supstance ne bi trebala vršiti na osnovu granične vrednosti za permeabilnost, kao što je najčešće slučaj. Kao granična vrednost za visoku permeabilnost u slučaju Caco-2 ćelija se uzima vrednost od  $2 \times 10^{-6}$  do  $10^{-5}$  cm/s (402). Umesto toga da bi se lekovita supstanca klasifikovala kao nisko ili visoko permeabilna trebalo bi dobijenu vrednost za permeabilnost porediti sa permeabilnosti referentnog standarda za visoku/nisku permeabilnost (npr. metoprolol), koja je određena pod istim uslovima kao i za ispitivanu lekovitu supstancu (403).

## 5.2. Napredna analiza podataka

### 5.2.1. Model za predviđanje intestinalne permeabilnosti u ljudi

Izabrani molekularni deskriptori (TPSA, HBD i HB) za 37 lekovitih supstanci za koje postoje pouzdani podaci o koeficijentu permeabilnosti određeni u okviru *in vivo* studija intestinalne perfuzije u ljudi (deo seta A, Tabela 2) su korišteni za kreiranje prediktivnog *in silico* modela pomoću nerekurzivne neuronske mreže trenirane algoritmom povratne propagacije, višeslojni perceptron. Sastav primenjenog trening seta, test seta i eksternog seta, kao i identifikovani outlieri prikazani su u Tabeli 5. Testirane su različite strukture mreže da bi se pronašao najbolji model, koji karakterišu najniža RMSE vrednost i najviše  $R^2$  vrednosti za trening, test i eksterni validacioni set. Arhitektura izabranog ANN modela (Slika 6) je uključivala četiri neurona u ulaznom sloju, četiri neurona u skrivenom i jedan neuron u izlaznom sloju. Mreža je trenirana kroz 500 trening ciklusa pri čemu je brzina učenja bila podešena na 0,9, a zamah (engl. *Momentum*) na 0,33. Da bi se osigurala reproducibilnost dobijenih rezultata, dodeljivanje početnog elementa u generatoru slučajnih brojeva (engl. *Local random seed*) je podešeno na 500. S obzirom na to da je kao funkcija aktiviranja korištena sigmoidalna funkcija, raspon vrednosti varijabli u setu je podešen na -1 i +1 pre početka procesa treniranja.



Slika 6. Arhitektura primenjene ANN za predviđanje intestinalne permeabilnosti u ljudi

Vrednosti statističkih parametara dobijene nakon izvršene desetostruke unakrsne validacije na trening setu, koji je sadržao 20 lekovitih supstanci (Tabela 5), su bile  $Q^2 = 0,800$  i  $RMSE_{cv} = 2,292$ , dok su vrednosti statističkih parametara za test set sa 10 supstanci (Tabela 5) bile  $R_T^2 = 0,798$  i

RMSE<sub>T</sub> 1,023. Dobijeni rezultati su bili u skladu sa kriterijumima za procenu prediktivne moći modela, koje su kreirali Tropsha i saradnici (243).

Tabela 5. Podela supstanci iz seta podataka A na setove za trening i validaciju modela za predviđanje permeabilnosti

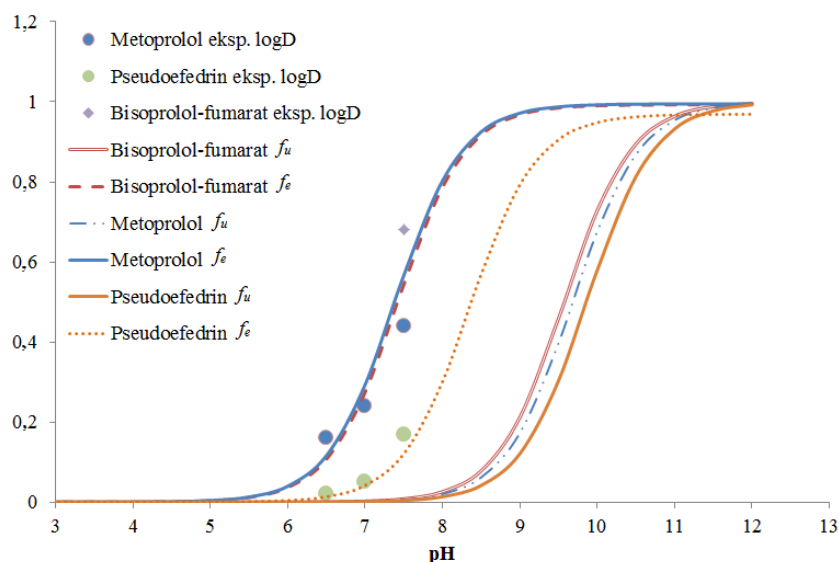
Tip seta	Lekovite supstance
<b>trening</b>	karbamazepin fluvastatin-natrijum naproksen piroksikam amjodaron verapamil-hidrohlorid oksiprenolol amoksicilin cefaleksin hidrohlortiazid talinolol terbutalin ranitidin metformin-hidrohlorid enalaprilat feksofenadin paracetamol fenoksimetil-penicilin inogatran izotretinoin
<b>test</b>	metoprolol propranolol amilorid losartan digoksin cimetidin antipirin griseofulvin dezipramin furosemid
<b>eksterni</b>	valaciklovir ketoprofen enalapril-maleat $\alpha$ -metildopa atenolol lizinopril L-dopa
<b>outlier</b>	kvercetin sulforafan

Domen primenjivosti ANN modela je određen za tri molekulska deskriptora u trening setu pomoću metode koju su opisali Dobchev i saradnici (404). Model je najpogodniji za supstance čije su vrednosti deskriptora (TPSA, HBD i HB) između maksimalne i minimalne vrednosti deskriptora u trening setu  $\pm 30\%$ . Dakle, domen primenjivosti razvijenog ANN modela je definisan sledećim opsegom vrednosti deskriptora:  $[37,3-163] \pm 37,71$  za TPSA,  $[0-5] \pm 1,5$  za HBD i  $[2-11] \pm 2,7$  za HB. Analiza domena primenjivosti je pokazala da se 9 od 10 supstanci u test setu nalazi unutar ovog domena (digoksin je jedina od ispitivanih lekovitih supstanci čije su vrednosti deskriptora bile izvan

definisano opsega). Razvijeni i validirani ANN model je primenjen i na eksternom setu, koje je sadržao 7 lekovitih supstanci (Tabela 5). Vrednosti  $R^2$  i RMSE za ovaj set su bile 0,681 i 2,321, redom.

Dobijeni model je potom korišten za predviđanje  $P_{eff}$  vrednosti preostalih supstanci iz seta A, za koje nisu dostupne eksperimentalno određene vrednosti ovog parametra. Rifampicin, primakvin i doksiciklin-hiklat, koji su inicijalno bili deo seta A (Tabela 2), su isključeni iz seta, jer su vrednosti njihovih molekulskih deskriptora bile izvan domena primenjivosti modela za predviđanje  $P_{eff}$ . Potom je uspostavljena korelacija između predviđenih  $P_{eff}$  vrednosti za supstance iz seta A i njihovih eksperimentalnih  $F_a$  vrednosti kod ljudi, na osnovu jednačine koju su predložili Fagerholm i saradnici (405). Koeficijent korelacije između predviđenih  $P_{eff}$  vrednosti za supstance iz seta A i njihovih eksperimentalnih  $F_a$  vrednosti kod ljudi je bio veoma nizak ( $R^2 = 0,3$ ).

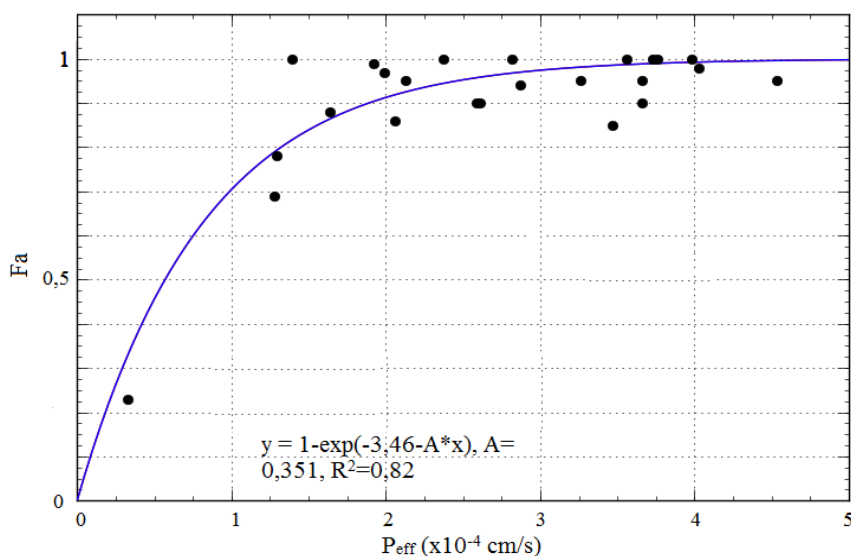
Dahn i saradnici (70) su pokazali da jedan od razloga za neslaganje između  $P_{eff}$  i  $F_a$  vrednosti lekovite supstance može biti pH-zavisna permeabilnost tj. lekovita supstanca, koja ima nisku jejunalnu permeabilnost, može imati visok procenat apsorpcije zahvaljujući visokoj  $P_{eff}$  vrednosti u nekom drugom delu tankog creva. Za kodein-fosfat je pomoću *in situ* intestinalne perfuzije na pacovu najveći koeficijent permeabilnosti izmeren u srednjem delu tankog creva (pH 7,0) (286). Kod bisoprolol-fumarata se takođe može očekivati pH-zavisna permeabilnost. Naime, Fairstein i saradnici (406) su zaključili da lekovita supstanca mora posedovati baznu funkcionalnu grupu da bi pokazala pH-zavisnu rastvorljivost pri čemu ona ne mora da bude jedini jonizujući centar u molekulu. Ovo je pokazano na primeru slabih baza sotalola ( $pK_a$  8,38 i 9,47) i pseudoefedrina ( $pK_a$  9,86) kod kojih je u proksimalnom delu tankog creva pacova izmerena niska permeabilnost, koja je postepeno rasla sa porastom pH vrednosti kroz tanko crevo i postala visoka pri pH 7,5 u ileumu (70, 406). U oba slučaja je metoprolol ( $pK_a = 9,68$ ), čije je procenat apsorpcije preko 90%, korišten kao marker za visoku/nisku permeabilnost. Bisoprolol ima baznu funkcionalnu grupu, sekundarni amin, čija je  $pK_a$  vrednost 9,57 (407). Njegova  $\log P$  vrednost je 2,15 (407) što je blisko  $\log P$  vrednostima metoprolola ( $\log P = 2,3$ ) i pseudoefedrina ( $\log P = 1,5$ ). Na Slici 7 je dat grafički prikaz zavisnosti nejonizovane frakcije ( $f_u$ ) i frakcije ekstrahovane u oktanol ( $f_e$ ) od pH vrednosti za metoprolol, pseudoefedrin i bisoprolol.  $f_u$  i  $f_e$  profili su izračunati iz prethodno navedenih eksperimentalnih  $pK_a$  i  $\log P$  vrednosti pomoću Wagner i Sedman jednačine (408), koja je ranije korištena za izračunavanje ovih profila za sotalol i pseudoefedrin (70, 406).  $f_u$  vrednost metoprolola, pseudoefedrina i bisoprolola, kao baznih lekovitih supstanci, je 0 pri niskim pH vrednostima, a kako pH raste, raste i  $f_u$  dajući sigmoidalni profil. Krive zavisnosti  $f_e$  od pH, za sve tri supstance, prate isti sigmoidalni profil, ali su pomerene ka nižim pH vrednostima. Veličina pomaka je jednaka  $\log(P-1)$  u srednjoj tački  $f_e$  i  $f_u$  sigmoidalnih krivih (408, 409).  $f_e$  krive za bisoprolol i metoprolol su gotovo identične, dok se u poređenju sa pseudoefedrinom porast  $f_e$  vrednosti bisoprolola dešava na nešto nižim pH vrednostima. Ovo je očekivano s obzirom na to da je  $\log P$  vrednost bisoprolola vrlo slična  $\log P$  vrednosti metoprolola, ali je viša od  $\log P$  pseudoefedrina. Eksperimentalne  $\log D$  vrednost bisoprolola na pH 7,4 (299) i metoprolola i pseudoefedrina na tri pH vrednosti 6,5, 7,0 i 7,5 (406) su takođe prikazane na Slici 7 i dobro se poklapaju sa odgovarajućim teorijskim krivama. Dakle, na osnovu predočene teorijske analize se može zaključiti da bisoprolol verovatno prati sličan profil permeabilnosti kroz GIT-a kao pseudoefedrin i metoprolol.



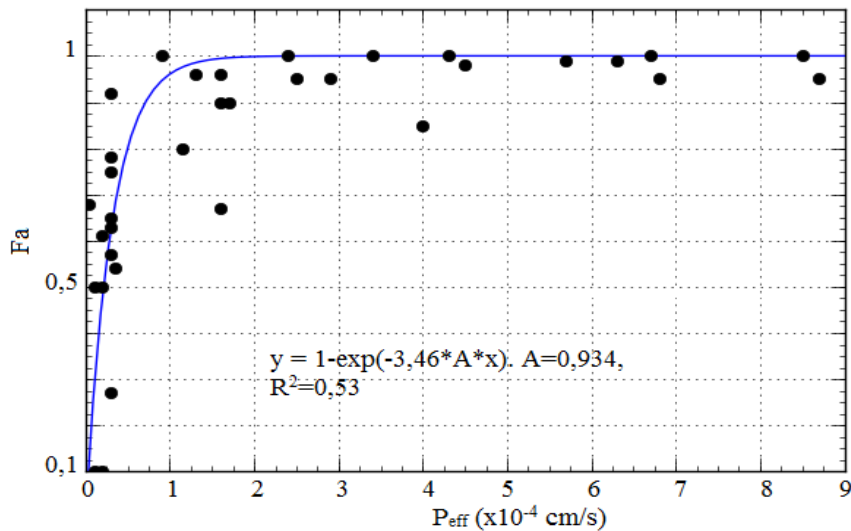
Slika 7. Grafik zavisnosti nejonizovane frakcije ( $f_u$ ) i frakcije ekstrahovane u oktanol ( $f_e$ ) od pH vrednosti za metoprolol, pseudoefedrin i bisoprolol

Može se pretpostaviti da je uzrok neslaganja između  $P_{\text{eff}}$  i  $F_a$  vrednosti za etambutol-dihidrohlid i efavirenc varijabilnost u apsorpciji (294, 304). Odstupanje između  $P_{\text{eff}}$  i  $F_a$  vrednosti je uočeno i kod ribavirina i amodiakvin-hidrohlrida što se u slučaju obe lekovite supstance može pripisati učešćem aktivnog transporta u procesu apsorpcije (410, 411).

Nakon isključivanja ovih šest lekovitih supstanci (bisoprolol-fumarat, kodein-fosfat, efavirenc, etambutol-dihidrohlid, ribavirin i amodiakvin-hidrohlrid) dobijen je visok koeficijent korelacije ( $R^2 = 0,82$ ) između predviđenih  $P_{\text{eff}}$  vrednosti za ostale supstance iz seta A i njihovih eksperimentalnih  $F_a$  vrednosti (Slika 8). Dakle, prilikom uspostavljanja korelacije između  $F_a$  i  $P_{\text{eff}}$  u cilju procene *in silico* modela za predviđanje permeabilnosti lekovitih supstanci potrebno je uzeti u obzir različite faktore, koji mogu da utiču na ponašanje lekovite supstance u GIT-u. Ovome u prilog govori i činjenica da je koeficijent korelacije između eksperimentalnih  $P_{\text{eff}}$  i  $F_a$  vrednosti lekovitih supstanci, koje su dali Dahlgren i saradnici (16), bio svega 0,52 (Slika 9).



Slika 8. Korelacija između procenta apsorbovanog leka ( $F_a$ ) kod ljudi i  $P_{\text{eff}}$  vrednosti predviđenih pomoću razvijenog ANN modela



Slika 9. Korelacija između procenta apsorbovanog leka ( $F_a$ ) i eksperimentalno određenih  $P_{eff}$  vrednosti kod ljudi preuzetih od Dahlgren i saradnika (16)

### 5.2.2. Klaster analiza seta podataka A

Klaster analizom I (KA IA), koja je bila zasnovana na D/S i  $P_{eff}$  kao ulaznim varijablama, je dobijeno šest klastera, koji su, redom, sadržali 21, 19, 15, 4, 3, i 2 lekovite supstance. U ovom slučaju analiza je bila zasnovana na obe glavne komponente. Pet slabo rastvorljivih lekovitih supstanci (ibuprofen, diklofenak-natrijum, griseofulvin, efavirenc i naproksen), čije su D/S vrednosti bile veće od 20000, su grupisane u klaster Ie ili If, u skladu sa njihovim D/S vrednostima. Klasteri Ia-Id su uključivali lekovite supstance grupisane na osnovu njihovih  $P_{eff}$  vrednosti, a nezavisno od D/S. Ova četiri klastera su karakterisale sledeće  $P_{eff}$  vrednosti: (1) klaster Ia: 0,01-0,9, (2) klaster Ib: 1,15-2,61, (3) klaster Ic: 2,82-4,53, (4) klaster Id: 5,7-8,7.

Klaster analizom II (KA IIA), koja je bila zasnovana na D/S,  $P_{eff}$  i  $F_a$  kao ulaznim varijablama, su dobijena tri klastera. U ovom slučaju analiza je bila zasnovana na dve glavne komponente, koje su zajedno objasnile 88,1% varijanse. Klaster IIA je sadržao 21 lekovitu supstancu, koje su grupisane prvenstveno na osnovu njihovih  $P_{eff}$  vrednosti ( $P_{eff} \leq 1,29 \times 10^{-4}$  cm/s), dok je klaster IIB sadržao 39 lekovitih supstanci grupisanih na osnovu visokog procenta apsorbovanog leka ( $F_a \geq 85\%$ ). Klaster IIC je uključivao četiri nisko rastvorljive lekovite supstance, čije su D/S vrednosti bile veće od 30000.

Primećeno je da su klasteri Ie i If (klaster analiza I) zbirno bili skoro identični klasteru IIC (klaster analiza II) i uključivali su nekoliko kiselih lekovitih supstanci (ibuprofen, diklofenak-natrijum i naproksen), koje su, uprkos visokim D/S vrednostima, dobro poznate po visokoj bioraspodivnosti, kojoj prethodi brza i potpuna apsorpcija. Ponovljena klaster analiza sa D/S vrednostima ovih supstanci pri fiziološkoj pH tankog creva je rezultirala njihovim premeštanjem u klaster Ic i Id, prema njihovim  $P_{eff}$  vrednostima (klaster analiza I), ili u klaster IIB u skladu sa njihovim  $F_a$  vrednostima (klaster analiza II).

Rezultati klaster analize seta podataka A su prikazani u Tabeli 6. Uporedo su prikazani podaci o BCS klasifikaciji navedenih supstanci preuzeti iz literature (233, 258, 412), ili izračunati na osnovu dostupnih podataka o rastvorljivosti i permeabilnosti ispitivanih supstanci.

Tabela 6. Rezultati klaster analize seta podataka A

	lekovita supstanca	KA I (6 klastera)	KA II (3 klastera)	BCS
1	L-dopa	Ic	IIb	1
2	antipirin	Id	IIb	1
3	dezipramin	Ic	IIb	1
4	metoprolol	Ib	IIb	1
5	propranolol	Ic	IIb	1
6	verapamil-hidrohlorid	Id	IIb	1
7	oksiprenolol	Ib	IIb	1
8	losartan	Ib	IIa	1
9	paracetamol	Ic	IIb	1
10	hlorokvin-fosfat	Ic	IIb	1
11	levetiracetam	Ic	IIb	1
12	levofloksacin	Ic	IIb	1
13	amitriptilin-hidrohlorid	Ic	IIb	1
14	metronidazol	Ic	IIb	1
15	prednizon	Ib	IIb	1
16	acetilsalicilna kiselina	Ic	IIb	1
17	prednizolon	Ib	IIb	1
18	zidovudin	Ib	IIb	1
19	bisoprolol-fumarat	Ia	IIb	1
20	amoksicilin	Ia	IIb	1/3
21	amilorid	Ib	IIb	1/3
22	valaciklovir	Ib	IIb	1/3
23	fluvastatin-natrijum	Ib	IIb	1/3
24	digoksin	Ia	IIa	1/3
25	enalapril-maleat	Ib	IIa	1/3
26	pirazinamid	Ic	IIb	1/3
27	stavudin	Ib	IIb	1/3
28	kodein-fosfat	Ia	IIb	1/3
29	flukonazol	Ic	IIb	1/3
30	metoklopramid-hidrohlorid	Ib	IIb	1/3
31	lamivudine	Ib	IIb	1/3
32	izoniazid	Ib	IIb	1/3
33	feksofenadin	Ia	IIa	1/3
34	hinidin-sulfat	Ic	IIb	1/3
35	cefaleksin	Ib	IIb	3
36	terbutalin	Ia	IIa	3
37	ranitidin	Ia	IIa	3
38	metformin-hidrohlorid	Ia	IIa	3
39	$\alpha$ -metildopa	Ia	IIa	3
40	atenolol	Ia	IIa	3
41	lizinopril	Ia	IIa	3
42	enalaprilat	Ia	IIa	3
43	cimetidin	Ia	IIa	3
44	ribavirin	Ia	IIa	3
45	etambutol-dihidrohlorid	Ia	IIa	3

46	diklofenak-natrijum	Ie	IIc	1/2
47	kinin	Ic	IIb	1/2
48	karbamazepin	Ic	IIb	2
49	naproksen	If	IIc	2
50	piroksikam	Id	IIb	2
51	amjodaron	Ia	IIb	2
52	ketoprofen	Id	IIb	2
53	griseofulvin	Ie	IIc	2
54	ibuprofen	Ie	IIb	2
55	nifedipin	Ib	IIb	2
56	talinolol	Ia	IIa	2/3
57	meflokvin-hidrohlorid	Ib	IIa	2/4
58	efavirenc	If	IIc	2/4
59	furosemid	Ia	IIa	2/3/4
60	ciprofloksacin-hidrohlorid	Ib	IIa	2/3/4
61	hidrohlortiazid	Ia	IIa	3/4
62	amodiakvin-hidrohlorid	Ia	IIa	3/4
63	aciklovir	Ia	IIa	3/4
64	acetazolamid	Ib	IIb	4

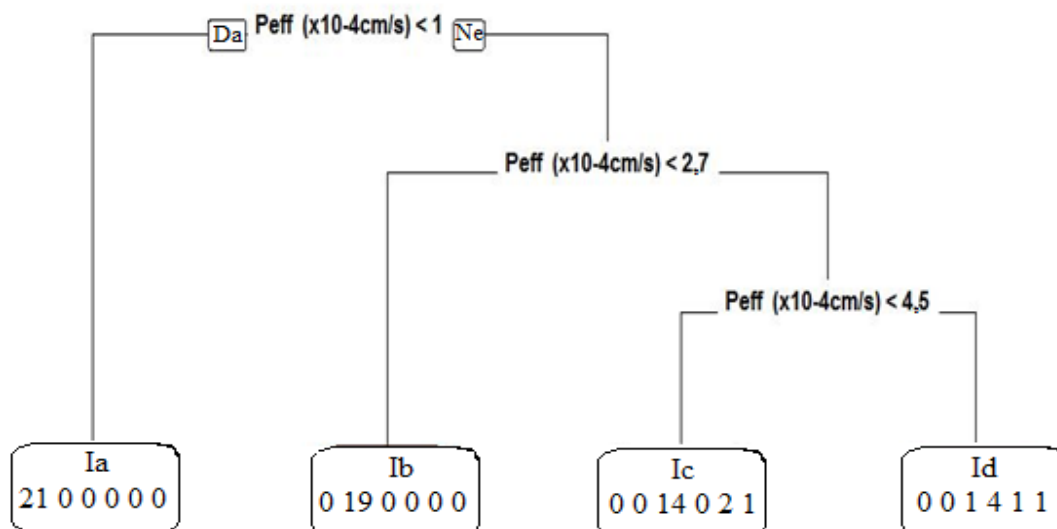
Rezultati klasifikacione analize, koja je sprovedena primenom algoritma stablo odlučivanja (Software R studio, rpart paket) i u kojoj su D/S,  $P_{eff}$  i Fa bili ulazni, a identifikovane grupe/klasteri izlazni parametar, su pokazali koje varijable su bile dominantne tokom procesa klasterovanja, kao i koje su njihove granične vrednosti za odgovarajuće klastere. Klasifikacijom I (zasnovana na D/S i  $P_{eff}$ ) je  $P_{eff}$  identifikovana kao varijabla koja bolje karakteriše dobijene klastere sa graničnim vrednostima  $1 \times 10^{-4}$ ,  $2,7 \times 10^{-4}$  cm/s i  $4,5 \times 10^{-4}$  cm/s (Slika 10). Iako klasifikacijom nisu dobijene relevantne granične vrednosti za D/S, uočeno je da su lekovite supstance iz klastera Ie i If imale  $P_{eff}$  vrednosti iznad  $2,7 \times 10^{-4}$  cm/s, ali su se razlikovale od lekovitih supstanci grupisanih u klastere Ic i Id po svojim visokim D/S vrednostima, koje su bile iznad 20000. Sa druge strane, klasifikacijom II (zasnovana na D/S,  $P_{eff}$  i Fa) identifikovana je Fa kao varijabla koja je najjače povezana sa dobijenim klasterima i njena granična vrednost je bila 82% (Slika 10). Dakle, iako je rastvorljivost, preko vrednosti D/S parametra, bila jedna od ulaznih varijabli za klaster i klasifikacione analize, ovaj parametar nijednom nije identifikovan kao značajan za proces klasterovanja i klasifikacije lekovitih supstanci. Slične rezultate su dobili i Newby i saradnici (236) pomoću metode klasifikacionih i regresionih stabala (engl. *Classification and regression trees*, C&RTs). Pomenuti autori su приметili da rastvorljivost nije bila značajna za predviđanje apsorpcije lekovite supstance u meri u kojoj su očekivali tj. dobijeni rezultati su pokazali da je permeabilnost najvažniji faktor za predviđanje apsorpcije posle oralne primene lekovitog preparata.

Na Slici 11 je dat grafički prikaz D/S i  $P_{eff}$  vrednosti za lekovite supstance iz analiziranog seta A sa graničnim vrednostima ovih varijabli dobijenim nakon klasifikacije I. Klasifikacijom podataka na osnovu D/S i  $P_{eff}$ , su, u pogledu  $P_{eff}$  vrednosti, identifikovane tri podgrupe lekovitih supstanci: (a) niske, (b) srednje i (c) visoke permeabilnosti. Granična vrednost za nisku permeabilnost ( $1 \times 10^{-4}$  cm/s) je bliska  $P_{eff}$  vrednosti metoprolola ( $1,3 \times 10^{-4}$  cm/s), koji je opšte prihvaćeni referentni standard za visoku/nisku permeabilnost. Hansmann i saradnici (413) su, na osnovu PBPK simulacija, zaključili da je vrednost permeabilnosti od  $1,1 \times 10^{-4}$  cm/s minimalan zahtev za klasifikaciju lekovite supstance kao visoko permeabilne. Rezultati klasifikacije podataka sprovedeni u ovom istraživanju su pokazali da vrednost permeabilnosti od  $1 \times 10^{-4}$  cm/s predstavlja granicu između niske i srednje permeabilnosti, dok je granična vrednost za visoku permeabilnost  $2,7 \times 10^{-4}$  cm/s. "Srednje permeabilne" lekovite supstance (klaster Ib) u ispitivanom setu podataka su imale  $P_{eff}$  vrednosti između  $1,15 \times 10^{-4}$  i  $2,61 \times 10^{-4}$  cm/s, raznolike vrednosti rastvorljivosti i visok obim

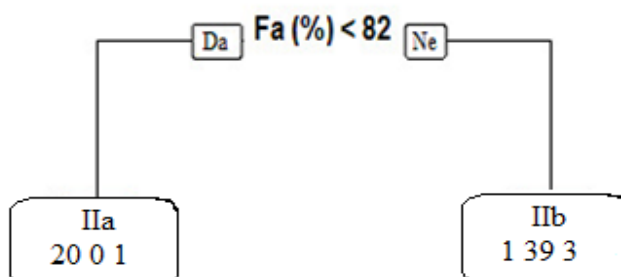
apsorpcije (osim enalapril-maleata koji je prolek, i ciprofloksacin-hidrohlorida za koji se pretpostavlja da je supstrat za intestinalne efluks transportere (414)). Od 19 lekovitih supstanci grupisanih u klaster Ib, 13 bi se rastvorilo u manje od 250 ml, 2 u manje od 500 ml, dok bi za potpuno rastvaranje 4 lekovite supstance (acetazolamid, meflokvin-hidrohlid, nifedipin i ciprofloksacin-hidrohlid) bilo potrebno više od 500 ml (do 4500 ml) medijuma. "Visoko permeabilne" lekovite supstance (klasteri Ic - If) su imale  $P_{eff}$  vrednosti veće od  $2,7 \times 10^{-4}$  cm/s i obim apsorpcije  $\geq 85\%$  (sa izuzetkom efavirenca, koji, kao što je već pomenuto, pokazuje varijabilnu apsorpciju (304)). Klaster Id lekovitih supstanci, čije su  $P_{eff}$  vrednosti bile veće od  $4,5 \times 10^{-4}$  cm/s, se mogu smatrati podgrupom unutar "visoko permeabilne" klase. Sa D/S naspram  $P_{eff}$  grafika (Slika 11) se može videti da gornji levi deo grafika (označen kao O), koji je definisan D/S vrednostima većim od 20000 i  $P_{eff}$  vrednostima nižim od  $2,7 \times 10^{-4}$  cm/s, ne uključuje nijednu lekovitu supstancu iz analiziranog seta podataka. Takav nalaz podupire ideju da bi nisko rastvorljive/nisko permeabilne lekovite supstance bile loši kandidati za oralnu primenu. Gornji desni deo grafika (označen kao D), definisan D/S vrednostim većim od 20000 i  $P_{eff}$  vrednostima većim od  $2,7 \times 10^{-4}$  cm/s, uključuje visoko permeabilne supstance, čija je apsorpcija ograničena brzinom rastvaranja lekovite supstance. Delovi grafika označeni kao A, B i C uključuju lekovite supstance sa niskom, srednjom i visokom permeabilnošću, redom. Lekovite supstance, koje pokazuju nisku apsorpciju ( $F_a < 50\%$ ) se nalaze u delu A (koji takođe sadrži supstance, koje pokazuju srednju i visoku apsorpciju). Na Slici 11b se može uočiti da ove supstance uglavnom pripadaju BCS grupi 3. Deo B uključuje lekovite supstance sa srednjom ( $F_a$  u opsegu od 50 do 84%) i visokom apsorpcijom ( $F_a \geq 85\%$ ). Zanimljivo je da je skoro polovina ovih lekovitih supstanci u dostpunoj literaturi okarakterisana kao granična između BCS grupa 1 i 3 (Slika 11b). Sve lekovite supstance u delu C i D pokazuju visoku apsorpciju (sa izuzetkom efavirenca, koji pokazuje varijabilnu apsorpciju (304)). Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima, koji ukazuju na to da će se visoko permeabilne lekovite supstance dovoljno dobro apsorbovati bez obzira na rastvorljivost (405), jer će visoke  $P_{eff}$  vrednosti kompenzovati nisku rastvorljivost lekovite supstance (164, 405, 415). Međutim, u slučaju nekih lekovitih supstanci iz BCS grupe 2 (Slika 11b) sa D/S vrednostima većim od 20000, kao što je npr. naproksen ( $D/S = 71428,57$ ), će verovatno biti potrebna veoma visoka permeabilnost ( $P_{eff} > 4,5 \times 10^{-4}$  cm/s) da bi se kompenzovala niska rastvorljivost. Takođe, dobijeni rezultati su ukazali na postojanje grupe lekovitih supstanci sa srednjim vrednostima permeabilnosti, koje variraju od  $1 - 2,7 \times 10^{-4}$  cm/s (deo grafika označen kao B). Lekovite supstance iz ove grupe se, generalno, dobro apsorbuju, a njihova apsorpcija je gotovo potpuna ukoliko je ograničena permeabilnost praćena visokom rastvorljivošću. Bergstrom i saradnici (169) i Macheras i Karalis (175) su takođe istakli značaj uvođenja "srednje" klase za permeabilnost lekovitih supstanci u cilju boljeg predviđanja njihove apsorpcije. Ovakva zapažanja su u skladu i sa podacima navedenim u okviru ICH smernice M9 u kojoj su kao granice između različitih kategorija permeabilnosti definisane odgovarajuće vrednosti stepena apsorpcije ( $F_a$ ): visoka permeabilnost -  $F_a \geq 0,85$ ; umerena permeabilnost -  $0,50 < F_a < 0,84$ ; niska permeabilnost -  $F_a < 0,50$ . Kao što je već pomenuto lekovite supstance sa  $F_a$  vrednostima manjim od 50% se nalaze u delu grafika A koji uključuje lekovite supstance sa niskom permeabilnošću, dok se lekovite supstance sa  $F_a$  vrednostima od 50 do 84% i većim od 85% nalaze u delovima grafika koji uključuju lekovite supstance sa umerenom (deo B) i visokom (deo C) permeabilnošću, redom. Međutim, deo grafika A sadrži i supstance sa  $F_a$  vrednostima većim od 50% što je posledica odstupanja između  $P_{eff}$  i  $F_a$  vrednosti o čemu je detaljno diskutovano u poglavlju 5.2.1.



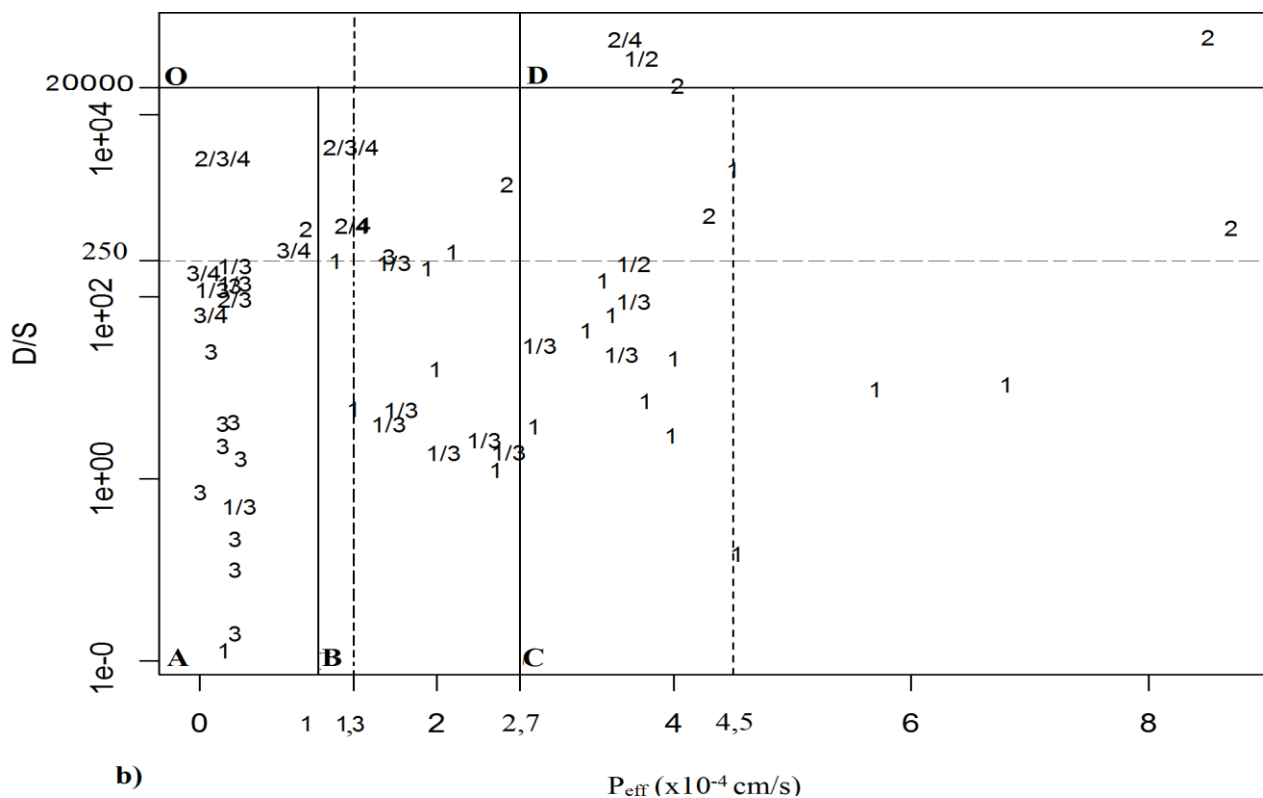
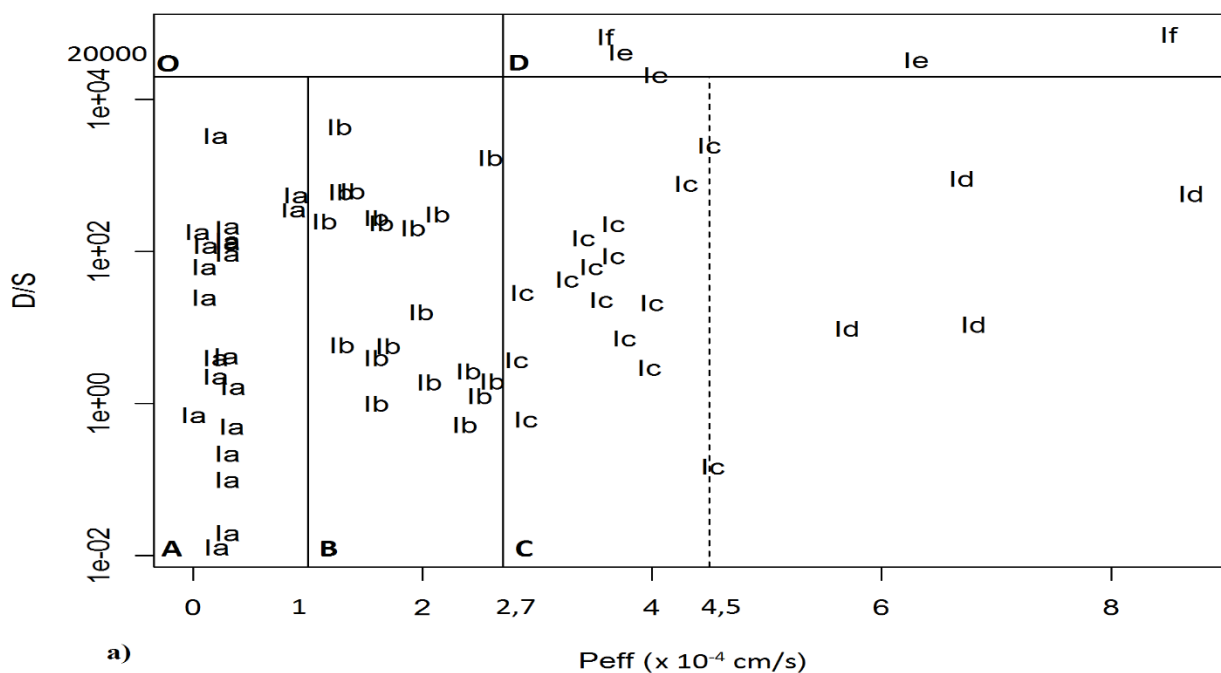
## Klasifikacija I



## Klasifikacija II



Slika 10. Stabla odluke dobijena klasifikacijom I (zasnovana na D/S i  $P_{eff}$ ) i klasifikacijom II (zasnovana na D/S,  $P_{eff}$  i Fa) za set podataka A; arapski brojevi u poljima sa oznakama klastera predstavljaju broj lekovitih supstanci koje su klaster analizom grupisane u svaki od dobijenih klastera



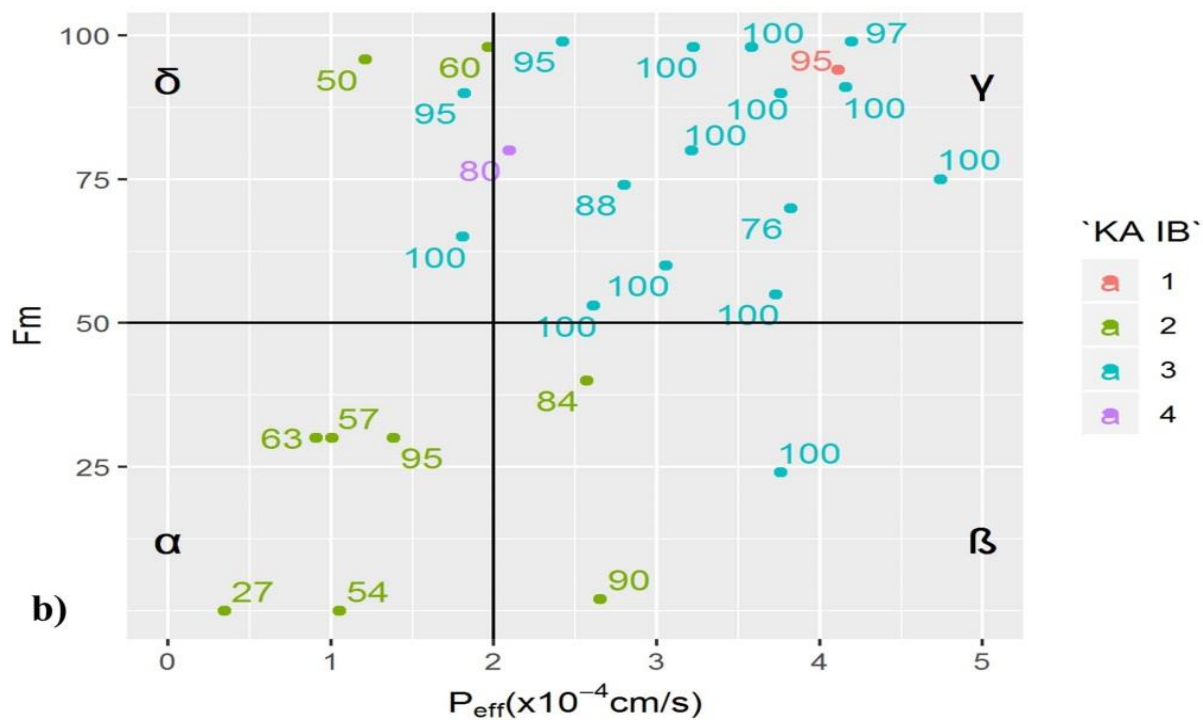
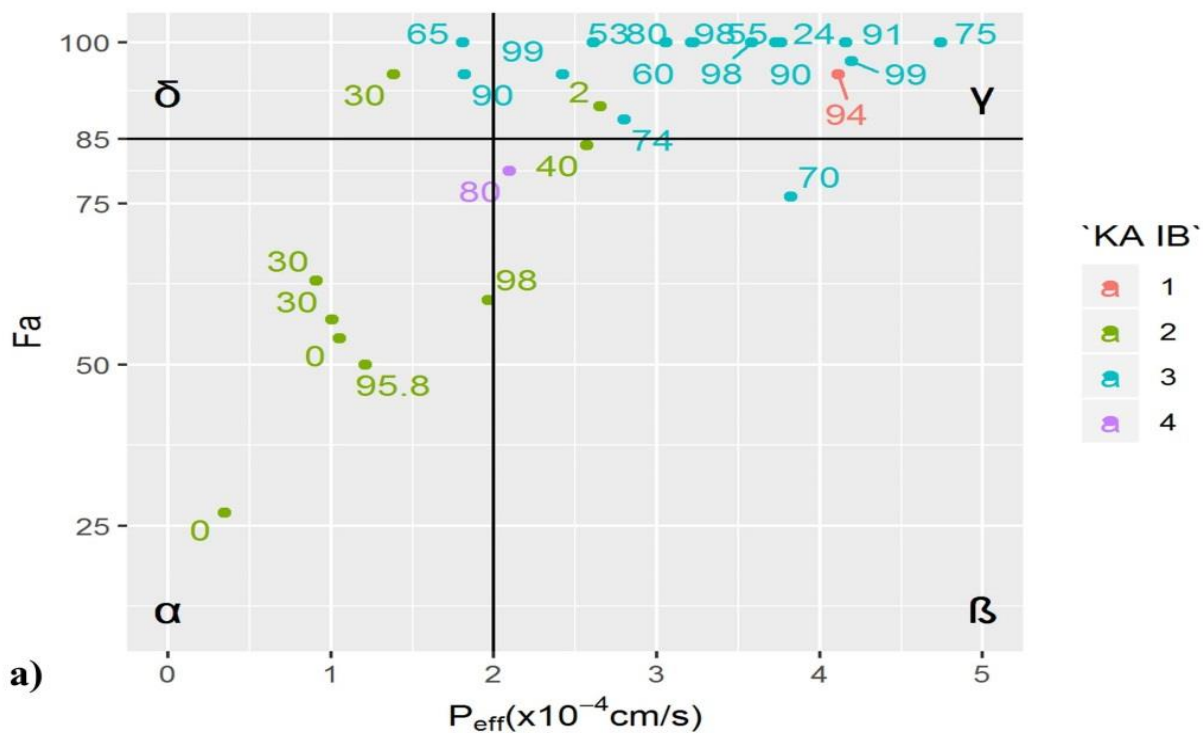
Slika 11. Grafički prikaz D/S i  $P_{eff}$  vrednosti za lekovite supstance iz analiziranog seta A sa grančnim vrednostima ovih varijabli dobijenim nakon klasifikacije I; domeni lekovitih supstanci sa istim biofarmaceutskim osobinama su označene kao A, B, C, D i O; oznake podataka se odnose na: a) klustere Ia-If, koji su identifikovani klaster analizom I i b) na pripadnost lekovite supstance BCS grupama 1-4 (granična vrednost 250 za D/S i 1,3 za  $P_{eff}$  se odnosi na BCS)

### 5.2.3. Klaster analize setova podataka B i C

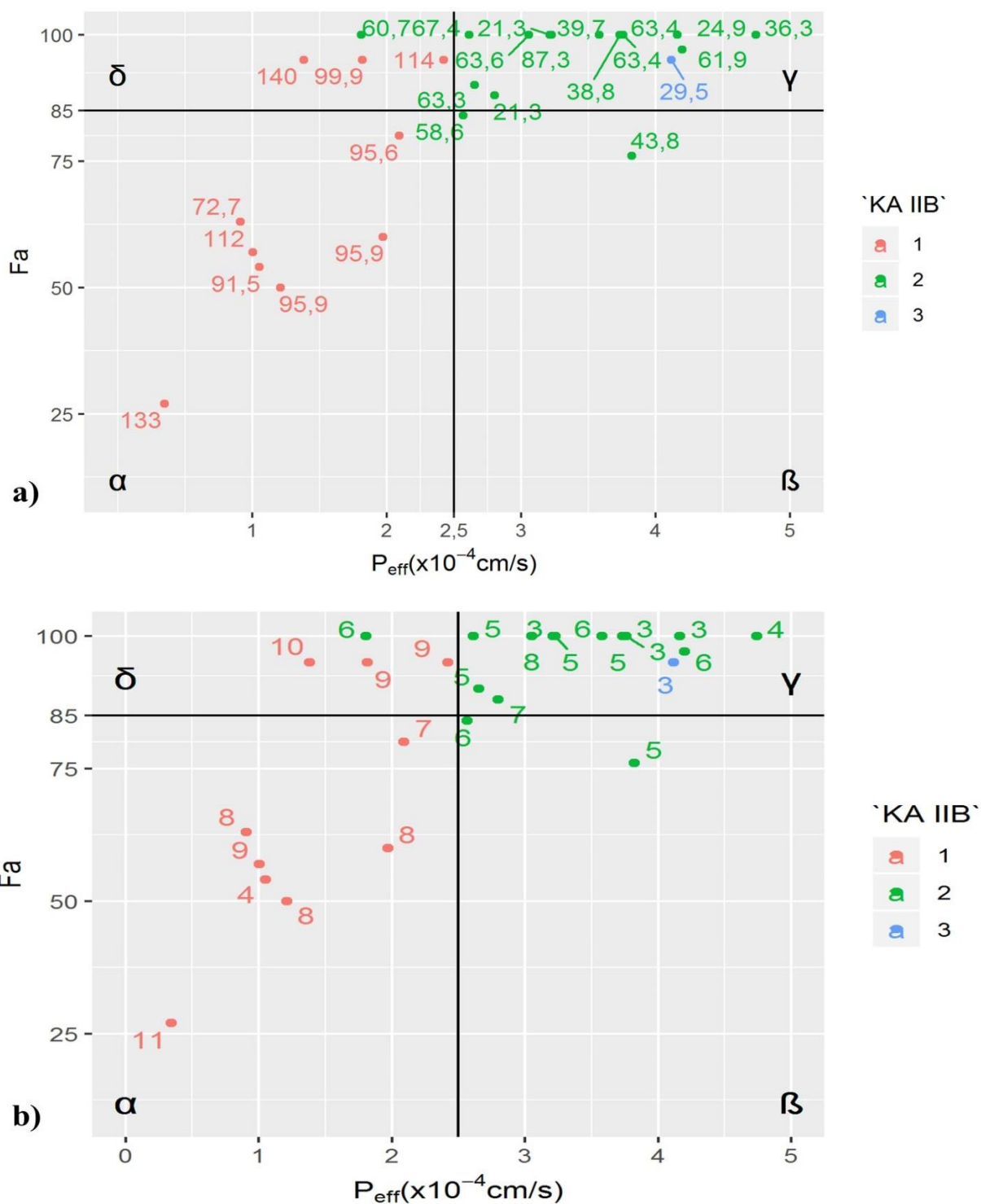
#### Set podataka B

Rezultati klaster analiza I-IV (KA I-IV) seta podataka B koji sadrži lekovite supstance za koje je u okviru *in vivo* studija pokazana biološka ekvivalentnost između oralno primenjenog rastvora i čvrstog farmaceutskog oblika su prikazani u Tabeli 7. Klaster analize su izvršene na tri glavne komponente, čije su svojstvene vrednosti (engl. *Eigenvalues*) bile veće od 0,7. Klaster analiza I (KA IB), koja se zasnivala na ukupno sedam kombinovanih biofarmaceutskih i farmakokinetičkih parametara ( $D/S$ ,  $P_{eff}$ ,  $F_a$ ,  $F_m$ ,  $PIK/D$ ,  $C_{max}/D$ ,  $t_{1/2}$ ) je rezultirala sa četiri klastera, koji su, redom, sadržali 1, 9, 16 i 1 lekovitu supstancu. Prema *desc.var* izveštaju, koji omogućava da se ulazne varijable rangiraju prema njihovom uticaju na proces klasterovanja, lekovite supstance su predominantno grupisane prema svojim  $F_a$ ,  $P_{eff}$  i  $F_m$  vrednostima. Vrednost  $v$ .testa ukazuje na to da je srednja vrednost za ove tri varijable u klasteru 2 značajno niža ( $p < 0,05$ ) od odgovarajućih srednjih vrednosti u celom setu B, dok su u klasteru 3 njihove srednje vrednosti značajno više u poređenju sa celim setom. Ovo praktično znači da u setu podataka B postoje dve grupe lekovitih supstanci u pogledu  $F_a$ ,  $P_{eff}$  i  $F_m$  vrednosti što se može uočiti i na Slici 12. Da bi se definisale njihove granične vrednosti za identifikovane klasterne, sprovedene su klasifikacione analiza za svaku od pomenutih varijabli kao ulaznim parametrom, dok su identifikovani klasteri bili izlazni parametar. Na graficima se vidi da je većina lekovitih supstanci grupisana u dva kvadranta ( $\alpha$  i  $\gamma$ ), čije su granice, na osnovu klasifikacione analize za svaku od dominantnih varijabli, definisane  $P_{eff}$  vrednostima od približno  $2 \times 10^{-4}$  cm/s i  $F_a$  i  $F_m$  vrednostima od 85% i 50%. Dronabinol je bio jedini član klastera 1 zbog ekstremne  $D/S$  vrednosti (3571). Međutim, ova lekovita supstanca pokazuje gotovo potpunu apsorpciju ( $F_a = 95\%$ ), zahvaljujući visokoj permeabilnosti (*in silico* predviđena  $P_{eff} = 4,11$ ), koja, kao što je već prethodno objašnjeno, kompenzuje nisku rastvorljivost. Klaster 4 je sadržao samo levotiroksin-natrijum zbog visokih  $PIK/D$  i  $C_{max}/D$  vrednosti i dugog poluvremena eliminacije ( $t_{1/2} = 180$  h).

Tri klastera dobijena u Klaster analizi II (KA IIB), koja se zasnivala na kombinaciji sedam biofarmaceutskih i fizičko-hemijskih parametara ( $D/S$ ,  $P_{eff}$ ,  $F_a$ ,  $MW$ ,  $TPSA$ ,  $clogP$  i  $HB$ ) su sadržala 10, 16, i 1 lekovitu supstancu. Prema *desc.var* izveštaju, klasterne 1 i 2 su karakterisale varijable  $TPSA$ ,  $HB$ ,  $P_{eff}$  i  $F_a$ . Srednje vrednosti  $TPSA$  i  $HB$  u klasteru 1 su bile značajno više u odnosu na srednje vrednosti za čitav set podataka, dok su vrednosti  $P_{eff}$  i  $F_a$  bile znatno niže. Lekovite supstance u klasteru 2 su imale niske  $TPSA$  i  $HB$  vrednosti i visoke  $P_{eff}$  i  $F_a$  vrednosti. U ovom slučaju, dronabinol je opet bio jedini član klastera 3. Dakle, klaster analizom IIB su takođe identifikovane dve grupe lekovitih supstanci. Da bi se definisale granične vrednosti za identifikovane klasterne, sprovedene su klasifikacione analiza za svaku od pomenutih varijabli kao ulaznim parametrom, dok su identifikovani klasteri bili izlazni parametar. Na Slici 13 je dat grafički prikaz dobijenih klastera i varijabli, koje su prema *desc.var* izveštaju najviše uticale na proces klasterovanja, kao i njihovih graničnih vrednosti koje su određene klasifikacionom analizom. Većina lekovitih supstanci je grupisana u dva kvadranta ( $\alpha$  i  $\gamma$ ), čije su granice definisane  $P_{eff}$  vrednostima od približno  $2,5 \times 10^{-4}$  cm/s i  $F_a$  vrednostima 85%. Takođe se uočava da je većina lekovitih supstanci u kvadrantu  $\gamma$  imala  $TPSA$  vrednosti  $\leq 67,4$ , dok su u kvadrantu  $\alpha$  lekovite supstance imale  $TPSA$  vrednosti  $\geq 72,7$ . Iako je raspon  $HB$  vrednosti za celi set podataka B bio relativno uzak (3-11) ipak se može uočiti da su lekovite supstance u kvadrantu  $\gamma$  imale nešto niže vrednosti ovog parametra ( $\leq 6,5$ ) u poređenju sa supstancama iz kvadranta  $\alpha$ .



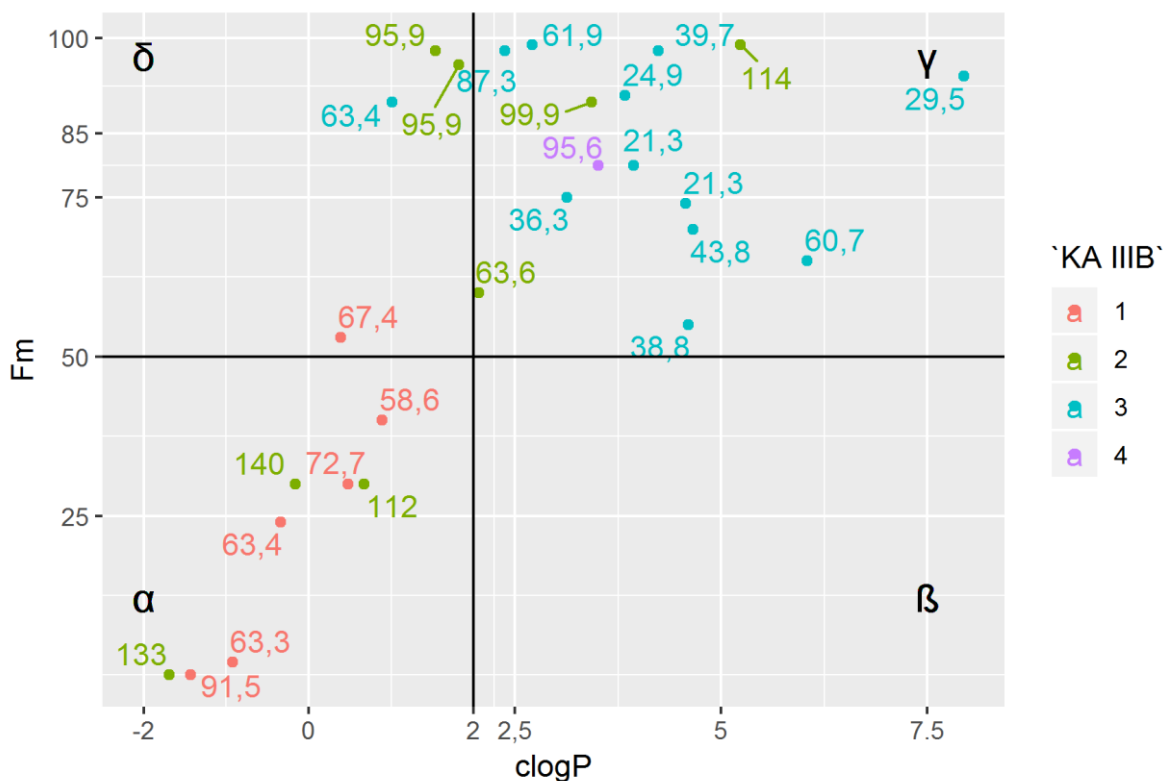
Slika 12. Grafički prikaz rezultata klaster analize IB i klasifikacionih analiza; oznake podataka se odnose na: a) Fm i b) Fa



Slika 13. Grafički prikaz rezultata klaster analize IIB i klasifikacionih analiza; a) oznake podataka se odnose na: a) TPSA i b) HB

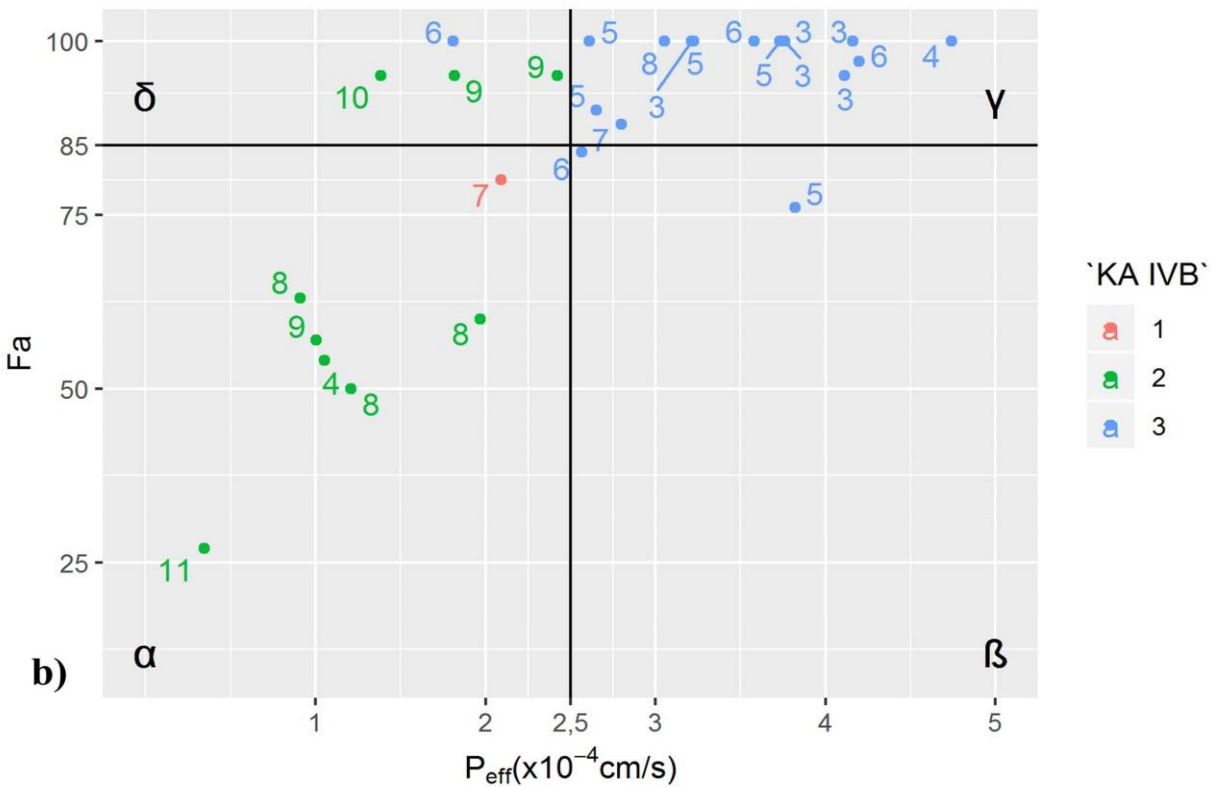
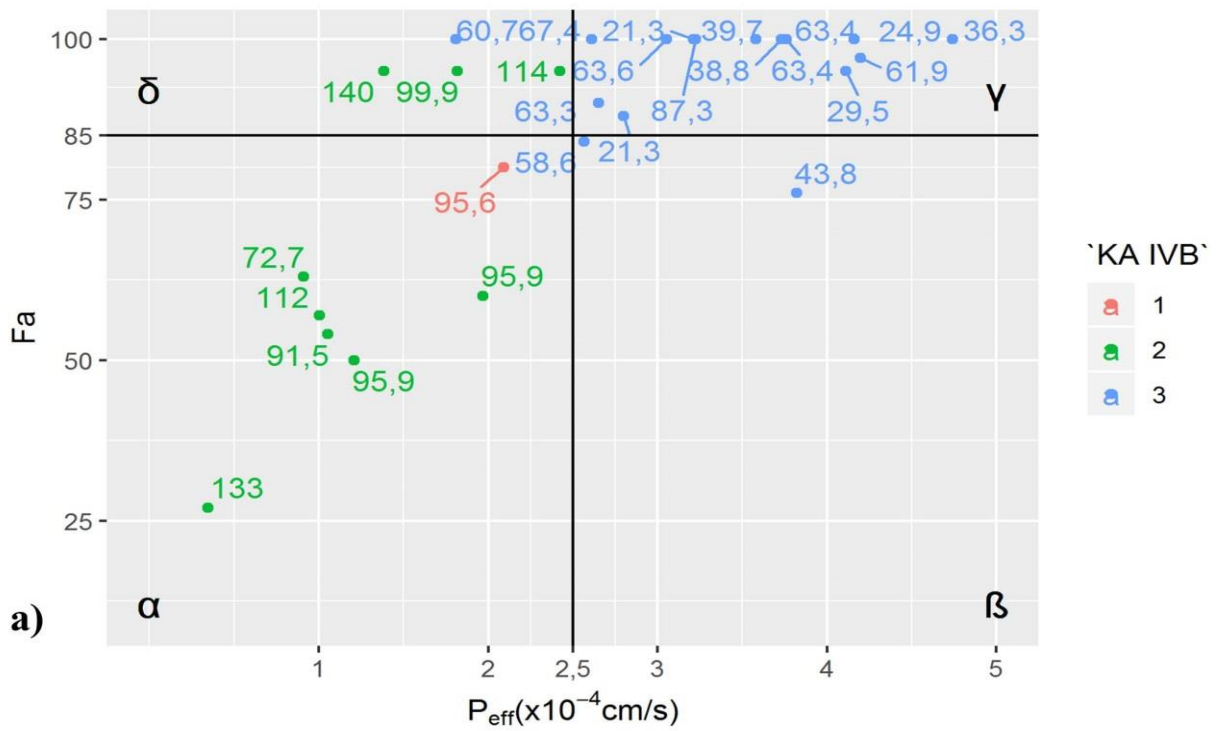
Klaster analiza III (KA IIB), zasnovana na kombinaciji osam farmakokinetičkih i fizičko-hemijskih parametara ( $F_m$ ,  $PIK/D$ ,  $C_{max}/D$ ,  $t_{1/2}$ ,  $clogP$ , TPSA, HB i MW) rezultirala je sa četiri klastera, koji su obuhvatali 6, 8, 12 i 1 lekovitu supstancu. Lekovite supstance su grupisane pretežno u skladu sa vrednostima molekularskih deskriptora (HB, TPSA i  $clogP$ ) i  $F_m$ . Srednje vrednosti  $clogP$  i  $F_m$ , lekovitih supstanci u klasteru 1, su bile značajno niže ( $p < 0,05$ ) u odnosu na srednje vrednosti u celom setu, dok su za lekovite supstance u klasteru 3, ove vrednosti bile značajno više u odnosu na celi set podataka. Granične vrednosti za identifikovane klastera su definisane pomoću klasifikacione analize sprovedene za svaku od pomenutih varijabli kao ulaznim parametrom, dok su identifikovani

klasteri bili izlazni parametar. Na Slici 14, koja predstavlja grafički prikaz dobijenih klastera i clogP i Fm varijabli, se jasno uočava da su lekovite supstance grupisane u dva kvadranta ( $\alpha$  i  $\gamma$ ), čije su granice definisane, pomoću klasifikacione analize, clogP vrednostima od približno 2 i Fm vrednostima 50 %. Klaster 2 je uključivao lekovite supstance, koje su tako grupisane zbog viših HB ( $\geq 7,5$ ) i TPSA vrednosti ( $\geq 63,6$ ), dok je levotiroksin-natrijum bio jedini član klastera 4.



Slika 14. Grafički prikaz rezultata klaster analize III B i klasifikacionih analiza; oznake podataka se odnose na TPSA

Klaster analiza IV (KA IVB), zasnovana na kombinaciji svih ispitivanih varijabli (ukupno 11) je rezultirala sa tri klastera. Levotiroksin-natrijum je, opet, bio jedini član klastera 1 zbog visokih PIK/D i  $C_{max}/D$  vrednosti, dobijenih kao posledica niske vrednosti najveće dozne jačine (200  $\mu\text{g}$ ), u poređenju sa drugim lekovitim supstancama iz seta B. Devet i sedamnaest lekovitih supstanci je, redom, smešteno u klaster 2 i 3, a na osnovu  $F_a$ ,  $P_{eff}$ , HB i TPSA vrednosti. Prema *desc.var* izveštaju, srednje vrednosti TPSA i HB u klasteru 2 su bile značajno više ( $p < 0,05$ ) u odnosu na srednje vrednosti za čitav set podataka, dok su vrednosti  $P_{eff}$  i  $F_a$  bile znatno niže. Lekovite supstance u klasteru 3 su imale niske TPSA i HB vrednosti i visoke  $P_{eff}$  i  $F_a$  vrednosti. Klaster analiza IVB takođe ukazuje na postojanje dve grupe lekovitih supstanci u setu podataka B. Granične vrednosti za identifikovane klaster 2 i 3 su definisane pomoću klasifikacione analize sprovedene za svaku od pomenutih varijabli ( $F_a$ ,  $P_{eff}$ , HB i TPSA) kao ulaznim parametrom, dok su identifikovani klasteri bili izlazni parametar. Kao što se može videti na Slici 15, koja predstavlja grafički prikaz rezultata KA IVB, postoji velika sličnost sa rezultatima KA IB (Slika 13). Naime, većina lekovitih supstanci je grupisana u dva kvadranta ( $\alpha$  i  $\gamma$ ), čije su granice definisane, pomoću klasifikacione analize,  $P_{eff}$  vrednostima od približno  $2,5 \times 10^{-4}$  cm/s i  $F_a$  vrednostima 85%. Lekovite supstance u kvadrantu  $\gamma$  su imale TPSA vrednosti  $\leq 67,4$ , dok su u kvadrantu  $\alpha$  lekovite supstance imale TPSA vrednosti veće od 72,7. Takođe se može primetiti da su lekovite supstance u kvadrantu  $\gamma$  imale nešto niže HB vrednosti ( $\leq 7,5$ ) u poređenju sa supstancama iz kvadranta  $\alpha$ .



Slika 15. Grafički prikaz rezultata klaster analize IVB i klasifikacionih analiza; a) oznake podataka se odnose na: a) TPSA i b) HB

Sve lekovite supstance iz seta podataka B (izuzev dronabinola i triflusal) su bile okarakterisane kao visoko rastvorljive prema BCS kriterijumima, ali su klaster analize otkrile postojanje dve grupe lekovitih supstanci u pogledu  $P_{eff}$  i  $F_a$  što je u skladu sa zapažanjem Newby i saradnika (236) da je permeabilnost najvažniji faktor za predviđanje apsorpcije lekovite supstance posle oralne primene preparata. Lekovite supstance su većinom grupisane unutar isitih klastera bez obzira na kombinaciju ulaznih varijabli. Pokazano je da supstance sa  $P_{eff}$  vrednostima većim od  $2 \times 10^{-4}$  cm/s i  $F_a$  vrednostima većim od 85% imaju i veće TPSA i HB vrednosti u odnosu na lekovite supstance čije su  $P_{eff}$  i  $F_a$  vrednosti bile manje od pomenutih graničnih vrednosti.

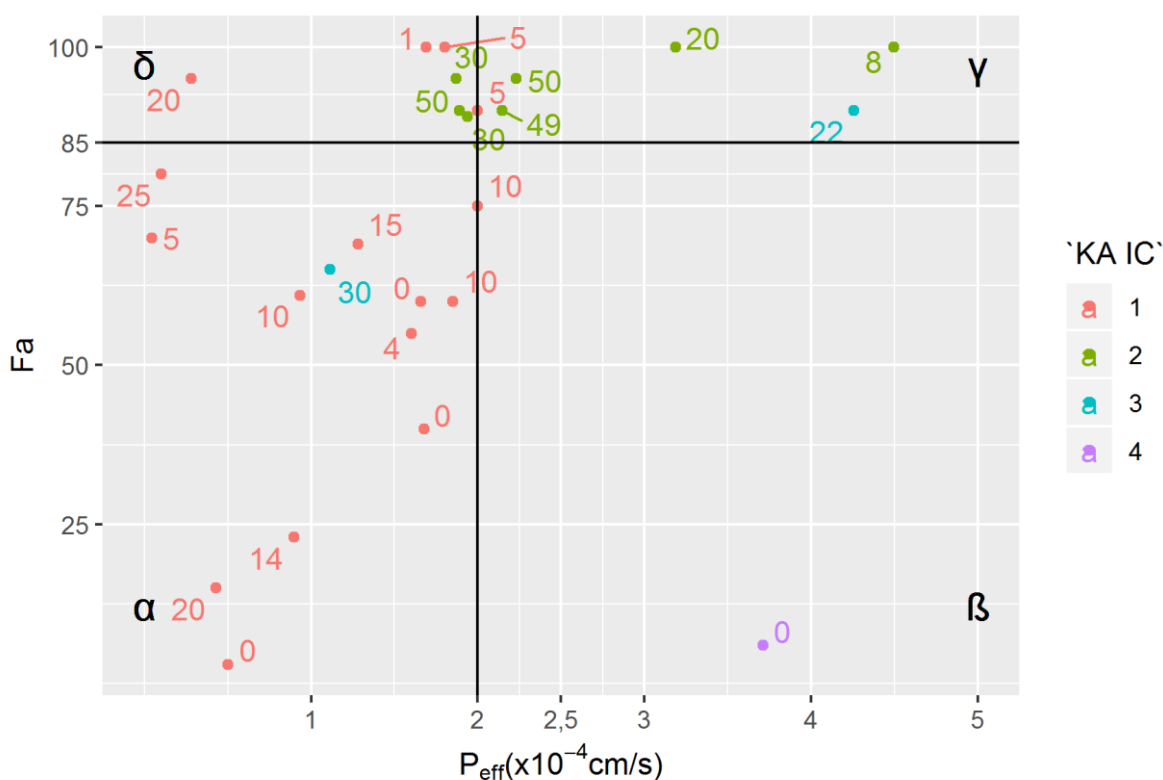
Tabela 7. Rezultati klaster analiza seta podataka B

lekovita supstanca	KA I (4 klastera)	KA II (3 klastera)	KA III (4 klastera)	KA IV (3 klastera)
dronabinol	1	3	3	3
nizatidin	2	1	2	2
pregabalin	2	2	1	3
terbutalin	2	1	1	2
lizinopril	2	1	2	2
ranitidin	2	1	2	2
ramirpil	2	1	2	2
benazepril	2	1	2	2
metformin-hidrohlorid	2	1	1	2
kaptopril	2	2	1	3
atomoksetin	3	2	3	3
citalopram	3	2	3	3
desloratadin	3	2	3	3
fluoksetin-hidrohlorid	3	2	3	3
kalcitriol	3	2	3	3
klonazepam	3	2	3	3
lakosamid	3	2	1	3
levetiracetam	3	2	1	3
nikardipin	3	1	2	2
paroksetin	3	2	3	3
risperidon	3	2	3	3
triflusal	3	2	2	3
donepezil-hidrohlorid	3	2	3	3
brivaracetam	3	2	3	3
amlodipin	3	1	2	2
loperamid-hidrohlorid	3	2	3	3
levotiroksin-natrijum	4	1	4	1



### Set podataka C

U slučaju seta podataka C, koji sadrži lekovite supstance za koje se u literaturi navodi da pokazuju nisku rastvorljivost i nisku permeabilnost, klaster analize I, III i IV su izvršene na četiri glavne komponente, dok je klaster analiza II izvršena na tri glavne komponente (rezultati su prikazani u Tabeli 8). Klaster analiza I (KA IC) je rezultirala sa četiri klastera, koji su, redom, sadržali 16, 7, 2 i 1 lekovitu supstancu. Prema *desc.var* izveštaju, lekovite supstance su grupisane u klaster 1 na osnovu vrednosti  $F_m$ ,  $P_{eff}$  i  $t_{1/2}$ , tj. njihove srednje vrednosti u klasteru 1 značajno su niže u odnosu na srednju vrednost celog seta. Može se pretpostaviti da su lekovite supstance grupisane u klaster 2 pretežno prema vrednostima  $F_m$ ,  $P_{eff}$  i  $F_a$ , koje su veće od srednje vrednosti u celom setu. Azapropazon i hlortalidon su odvojeni u klaster 3 zbog visokih  $PIK/D$  i  $C_{max}/D$  vrednosti. Atovakvon je bio jedini član klastera 4 zbog ekstremno visoke  $D/S$  vrednosti. Za svaku od pomenutih varijabli ( $F_m$ ,  $P_{eff}$ , i  $F_a$ ) su sprovedene klasifikacione analize da bi se definisale njihove granične vrednosti za identifikovane klasterne. Na Slici 16, koja predstavlja grafički prikaz rezultata KA IC, se uočava da je većina lekovitih supstanci grupisana u kvadrant  $\alpha$ , koji je, pomoću klasifikacionih analiza, definisan  $P_{eff}$  vrednostima manjim od  $2 \times 10^{-4}$  cm/s i  $F_a$  vrednostima manjim od 85%.  $F_m$  vrednosti lekovitih supstanci u kvadrantu  $\alpha$  su bile manje od 25%. Na grafiku se takođe vidi grupa lekovitih supstanci sa  $P_{eff}$  i  $F_a$  vrednostima većim od  $2 \times 10^{-4}$  cm/s i 85%, redom (kvadrant  $\gamma$ ).



Slika 16. Grafički prikaz rezultata klaster analize IC i klasifikacionih analiza; oznake podataka se odnose na  $F_m$

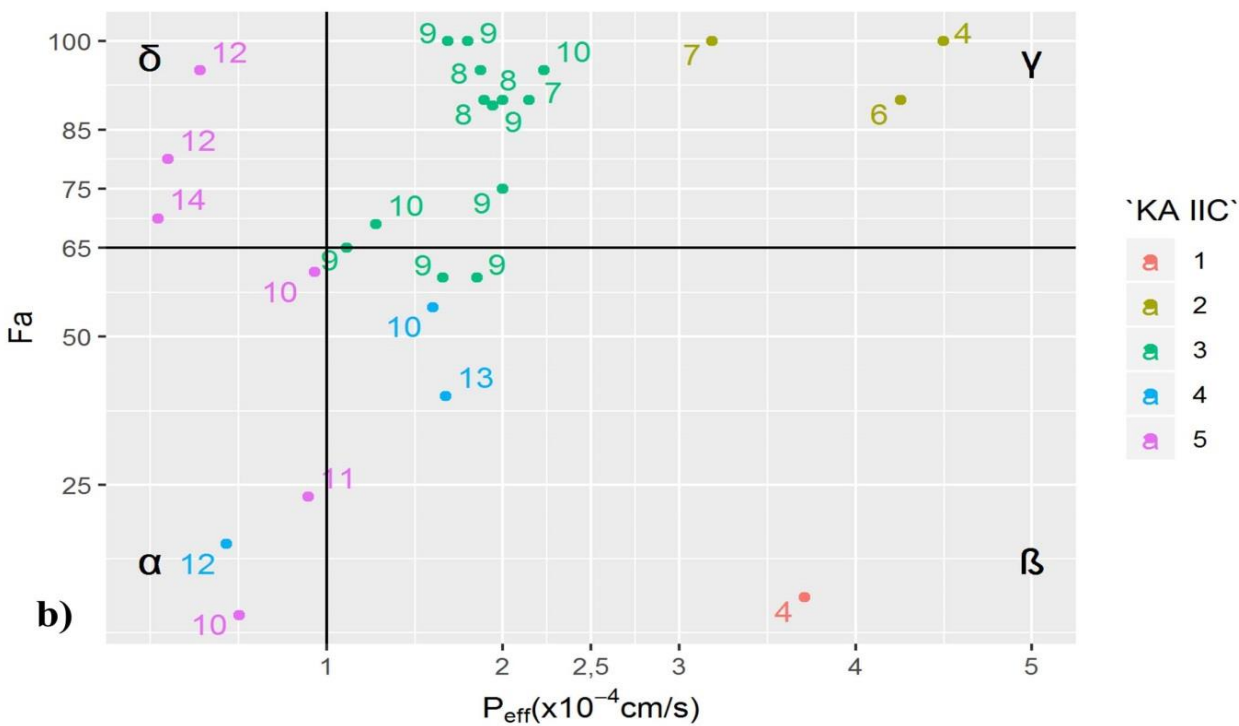
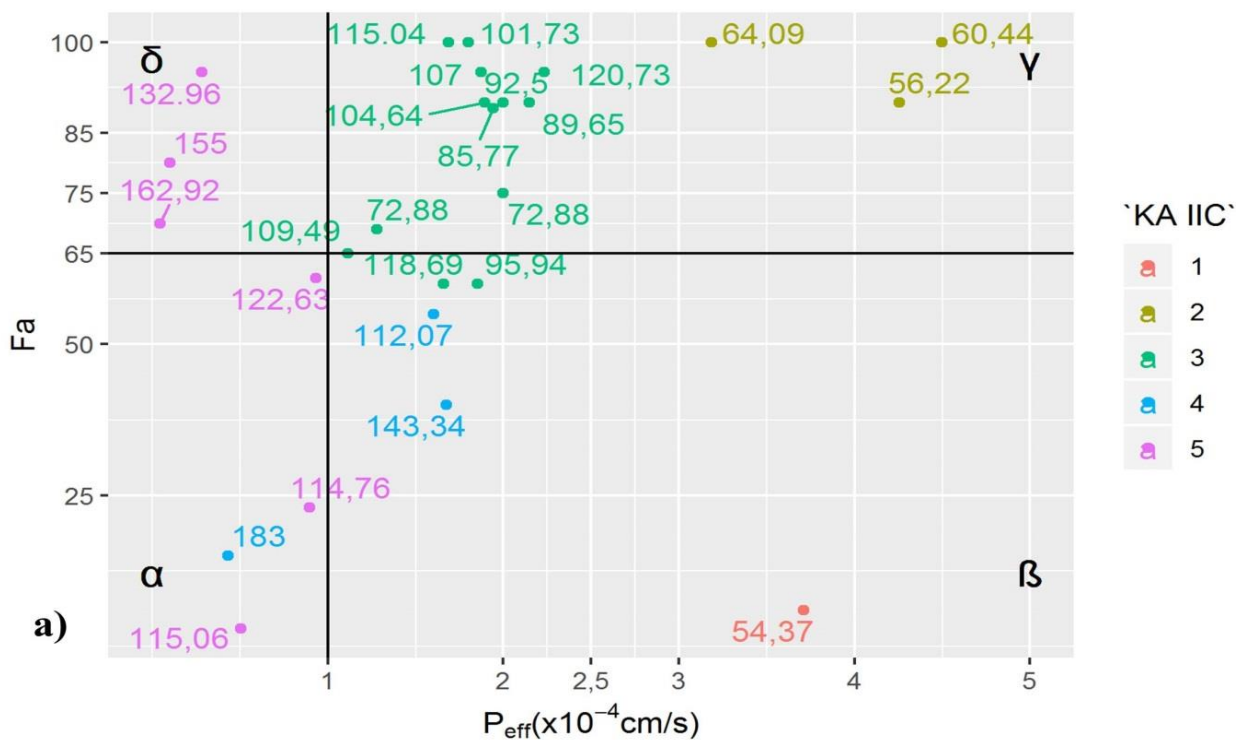
Pet klastera dobijenih klaster analizom II (KA IIC) je sadržalo 1, 3, 13, 3 i 6 lekovitih supstanci, redom. Klaster 1 je uključivao samo atovakvon. Klasteri 2 i 5 su bili povezani sa istim varijablama ( $P_{eff}$ ,  $TPSA$  i  $HB$ ). Prema rezultatima *v.testa* lekovite supstance u klasteru 2 su imale značajno više  $P_{eff}$  i značajno niže  $TPSA$  i  $HB$  vrednosti u odnosu na srednju vrednost ovih parametara u celom setu. Sa druge strane, u klaster 5 su bile grupisane lekovite supstance sa visokim  $TPSA$  i  $HB$  i niskim  $P_{eff}$  vrednostima. Lekovite supstance su grupisane u klaster 3 na osnovu visokih  $F_a$  vrednosti

i niskih MW vrednosti. Kandesartan-cileksetil, eprosartan-mezilat i valsartan su svrstani u klaster 4 zbog niskih Fa i visokih MW, clogP i TPSA vrednosti (u poređenju sa srednjim vrednostima u celom setu). Granične vrednosti za identifikovane klasterne su definisane pomoću klasifikacione analize sprovedene za svaku od najznačajnijih varijabli kao ulaznim parametrom, dok su identifikovani klasteri bili izlazni parametar. Kada su rezultati KA IIC i klasifikacionih analiza predstavljeni grafički uočeno je da je većina lekovitih supstanci grupisana u dva kvadranta ( $\alpha$  i  $\gamma$ ), čije su granice definisane  $P_{eff}$  vrednostima od približno  $1 \times 10^{-4}$  cm/s i Fa vrednostima 65% (Slika 17). Lekovite supstance u kvadrantu  $\gamma$  su imale TPSA vrednosti manje od 120,7, dok je većina lekovith supstanci u kvadrantu  $\alpha$  imale TPSA vrednosti veće od 120,7. Takođe se može primetiti da su lekovite supstance u kvadrantu  $\gamma$  imale nešto niže HB vrednosti ( $\leq 9,5$ ) u poređenju sa supstancama iz kvadranta  $\alpha$ .

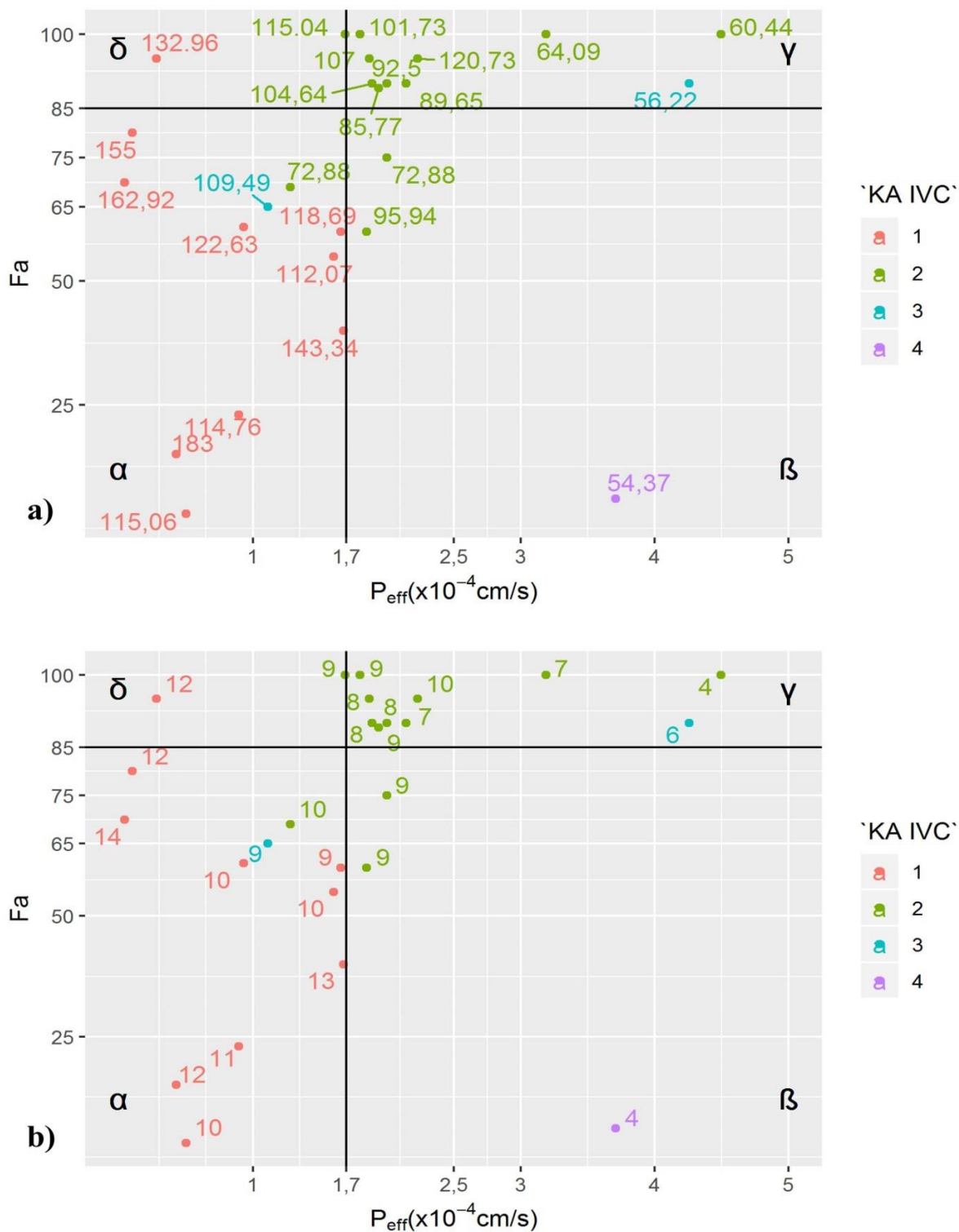
Klaster analizom III (KA IIIC) su takođe dobijena četiri klastera. Šest lekovitih supstanci je grupisano u klaster 1 na osnovu viših vrednosti molekulskih deskriptora (MW, HB i TPSA) u poređenju sa ostalim lekovitim supstancama iz istog seta. *Desc.var* izveštaj je pokazao da je 16 lekovitih supstanci grupirano u klaster 2 pretežno prema njihovim MW i clogP vrednostima, tj. da su njihove srednje vrednosti u klasteru 2 bile značajno niže u odnosu na srednje vrednosti u celom setu. Atovakvon i megestrol-acetat su svrstani u klaster 3 zbog visokih vrednosti clogP i  $t_{1/2}$  i niskih TPSA i HB vrednosti (u poređenju sa srednjim vrednostima u celom setu). Klaster 4 je sadržao samo azapropazon i hlortalidon zbog njegovih PIK/D,  $C_{max}/D$  i  $t_{1/2}$  vrednosti, koje su bile značajno više u odnosu na srednje vrednosti u setu. Dobijeni rezultati ukazuju da klaster analizom IIIC nije uspostavljena veza između fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih parametara analiziranih lekovitih supstanci.

Klaster analizom IV (KA IVC), koja je uključivala sve ispitivane ulazne varijable dobijena su četiri klastera. Atovakvon je bio jedini član klastera 4, dok je klaster 3 uključivao samo azapropazon i hlortalidon. 10 lekovitih supstanci je grupisano u klaster 1 na osnovu Fa,  $P_{eff}$ , HB i TPSA vrednosti. Prema *desc.var* izveštaju, TPSA i HB vrednosti lekovitih supstanci u klasteru 1 su bile značajno više, dok su vrednosti  $P_{eff}$  i Fa bile znatno niže u odnosu na srednje vrednosti u celom setu. Trinaest lekovitih supstanci je svrstano u klaster 2 na osnovu visokih Fa i niskih HB i TPSA vrednosti. Za svaku od najznačajnijih varijabli pojedinačno su pomoću klasifikacione analize definisane granične vrednosti. Na Slici 18, koja predstavlja grafički prikaz rezultata KA IVC, se vidi da se lekovite supstance iz klastera 1 nalaze u kvadrantu  $\alpha$ , koji je definisan  $P_{eff}$  vrednostima manjim od  $1,7 \times 10^{-4}$  cm/s i Fa vrednostima nižim od 85%. Lekovite supstance iz klastera 2 se nalaze u kvadrantu  $\gamma$ , koji je definisan  $P_{eff}$  vrednostima većim od  $1,7 \times 10^{-4}$  cm/s i Fa vrednostima višim od 85%. Takođe se uočava da su lekovite supstance sa visokim TPSA i HB vrednostima pretežno bile grupisane u kvadrantu  $\alpha$ .

Klaster analizama IC, IIC i IVC lekovite supstance su grupisane u tri ili četiri klastera (kada se izuzmu klasteri sa samo jednom supstancom). Granice između klastera lekovitih supstanci, koji su identifikovani klaster analizom IVC su definisane  $P_{eff}$  vrednostima većim od  $1,7 \times 10^{-4}$  cm/s i Fa vrednostima većim od 85% što je u skladu sa opšteprihvaćenim klasama visoka/niska permeabilnost.



Slika 17. Grafički prikaz rezultata klaster analize IIC i klasifikacionih analiza; oznake podataka se odnose na: a) TPSA i b) HB



Slika 18. Grafički prikaz rezultata klaster analize IVC i klasifikacionih analiza; oznake podataka se odnose na: a) TPSA i b) HB

Tabela 8. Rezultati klaster analiza seta podataka C

lekovita supstanca	KA I (4 klastera)	KA II (5 klastera)	KA III (4 klastera)	KA IV (4 klastera)
acetazolamid	1	3	2	2
aciklovir	1	5	2	1
amisulprid	1	3	2	2
kandesartan-cileksetil	1	4	1	1
cefprozil	1	5	1	1
ceftibuten	1	5	1	1
hlorotiazid	1	3	2	1
ciprofloksacin-hidrohlorid	1	3	2	2
klodronska kiselina	1	5	2	1
eprosartan-mezilat	1	4	1	1
furosemid	1	5	2	1
lenalidomid	1	3	2	2
norfloksacin	1	3	2	2
fenoksimetil- penicilin	1	3	2	2
valsartan	1	4	1	1
riboflavin	1	5	1	1
enoksacin	2	3	2	2
felbamat	2	3	2	2
fleroksacin	2	2	2	2
megestrol-acetat	2	2	3	2
nitrofurantoin	2	3	2	2
fenazopiridin-hidrohlorid	2	3	2	2
sulfisoksazol	2	3	2	2
azapropazon	3	2	4	3
hlortalidon	3	3	4	3
atovakvon	4	1	3	4

## Zbirni set podataka B i C

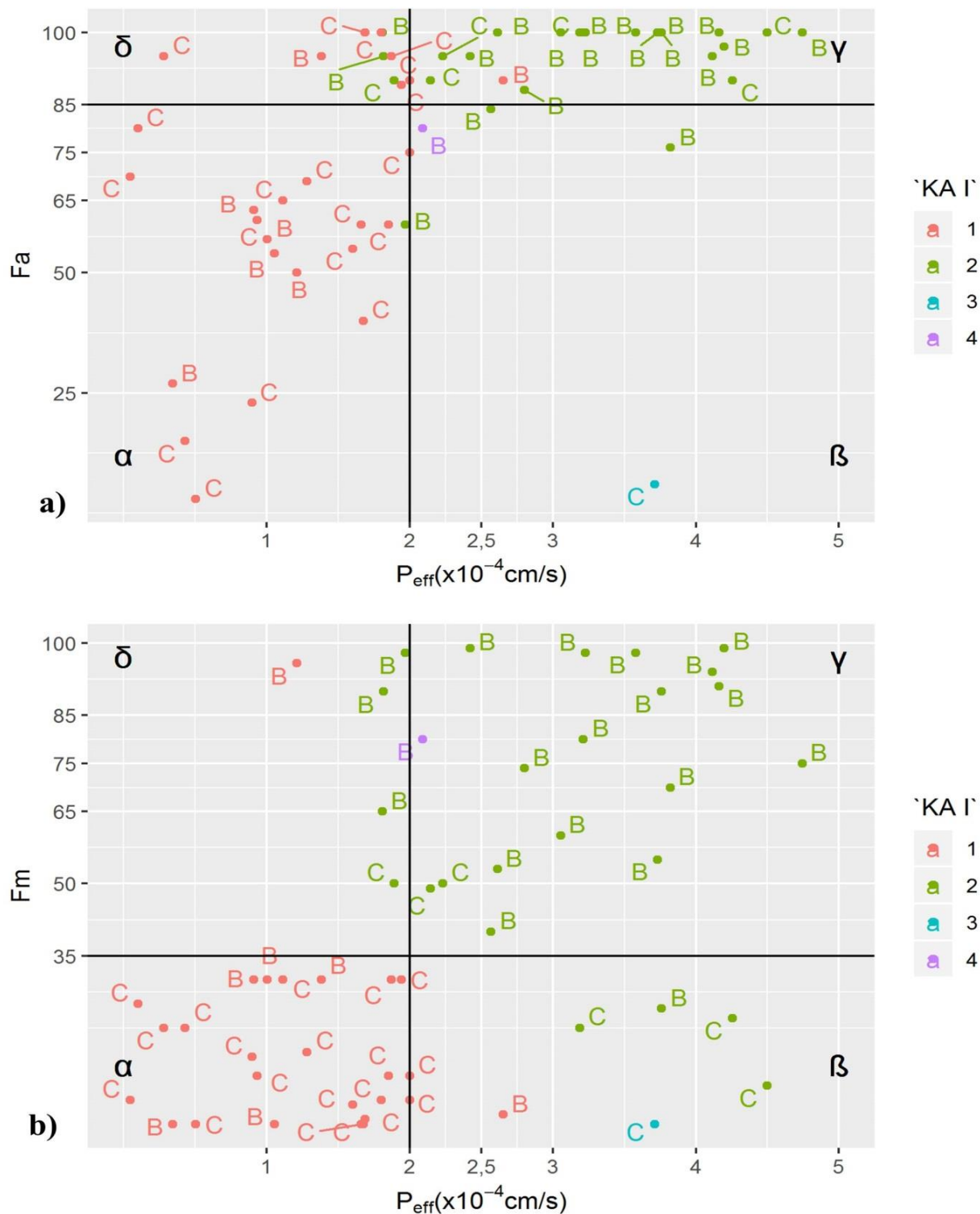
Rezultati klaster analiza koje su sprovedene na zbirnom setu podataka B i C su prikazani u Tabeli 9. Zbirni set podataka je sadržao međusobno veoma raznolike lekovite supstance sa sledećim rasponom ispitivanih parametara:

D/S:	0,1 - 5 x 10 <sup>6</sup>
P <sub>eff</sub> :	0,04 - 4,74 x 10 <sup>-4</sup> cm/s
Fa:	3 - 100%
Fm:	0 - 99%
MW:	129,16 - 776,87 Da
PSA:	21,3 - 183
clogP:	-2,42 - 7,94
HB:	3 - 14
PIK/D:	1 x 10 <sup>-6</sup> - 0,02
C <sub>max</sub> /D:	1 x 10 <sup>-6</sup> - 5,1 x 10 <sup>-4</sup>
t <sub>1/2</sub> :	0,5 - 180 h.

Klaster analize I, II i III su sprovedene na tri glavne komponente, dok je klaster analiza IV sprovedena na četiri glavne komponente. Četiri klastera dobijena u klaster analizi I (KA I) su sadržala 26, 25, 1 i 1 lekovitu supstancu, redom. Prema *desc.var* izveštaju, lekovite supstance su grupisane u klaster 1 pretežno prema njihovim Fa, Fm i P<sub>eff</sub> vrednostima, a u manjoj meri i t<sub>1/2</sub> vrednosti: p-vrednosti za t<sub>1/2</sub> su bile značajno niže u poređenju sa onim za Fa, Fm i P<sub>eff</sub>. Klaster 2 je bio povezan sa istim varijablama (Fa, Fm i P<sub>eff</sub>). Međutim, predznak vrednosti v.testa je ukazao na to da su srednje vrednosti ovih varijabli u klasteru 1 niže, dok su srednje vrednosti Fa, Fm i P<sub>eff</sub> u klasteru 2 značajno više od odgovarajućih srednjih vrednosti u celom zbirnom setu. Atovakvon i levotiroksin-natrijum su bili jedini članovi klastera 3 i 4. Za svaku od najznačajnijih varijabli pojedinačno su pomoću klasifikacione analize definisane granične vrednosti. Na Slici 20, koja predstavlja grafički prikaz rezultata klaster analize I (KA I) i klasifikacionih analiza, se može videti da se supstance iz klastera 1 pretežno nalaze u kvadrantu  $\alpha$  koji je definisan P<sub>eff</sub> vrednostima manjim od 2 x 10<sup>-4</sup> cm/s i Fa i Fm vrednostima manjim od 85% i 35%, redom. Takođe se vidi da sedam lekovitih supstanci iz klastera 1 pripada setu B, dok je ostalih 19 lekovitih supstanci iz seta C. Lekovite supstance iz klastera 1 su pretežno grupisane u kvadrantu  $\gamma$ , koji je definisan P<sub>eff</sub> vrednostima većim od 2 x 10<sup>-4</sup> cm/s i Fa i Fm vrednostima većim od 85% i 35%, redom. Od 25 lekovitih supstanci iz klastera 2 njih šest je pripadalo setu podataka C, dok je 19 bilo iz seta B.

Klaster analizom II (KA II) su dobijena tri klastera. Trideset i jedna lekovita supstanca je grupisana u klaster 1 na osnovu vrednosti PSA, HB, clogP, Fa i P<sub>eff</sub>. Srednje vrednosti PSA i HB u ovom klasteru su bile značajno više, dok su srednje vrednosti clogP, Fa i P<sub>eff</sub> bile značajno niže od odgovarajućih srednjih vrednosti u setu B. Za svaku od najznačajnijih varijabli pojedinačno su pomoću klasifikacione analize definisane granične vrednosti. Na slikama 20 i 21, koje predstavljaju grafički prikaz rezultata klaster analize II (KA II) i klasifikacionih analiza, se može uočiti da se većina lekovitih supstanci iz ovog klastera nalazi u kvadrantu  $\alpha$ , koji je definisan P<sub>eff</sub> vrednostima manjim od 2,5 x 10<sup>-4</sup> cm/s i Fa vrednostima manjim od 85%. PSA vrednosti ovih lekovitih supstanci su bile veće od 72,7, a HB vrednosti manje od 7. Većina supstanci sa P<sub>eff</sub> vrednostima manjim od 2,5 x 10<sup>-4</sup> cm/s su imala niske clogP vrednosti. Takođe se može primetiti da je 21 lekovita supstanca iz klastera 1 bila iz seta podataka C. Prema *desc.var* izveštaju, 21 lekovita supstanca je grupisana u klaster 2 na osnovu vrednosti istog skupa varijabli (PSA, HB, clogP, Fa i P<sub>eff</sub>). Međutim, srednje vrednosti PSA i HB u ovom klasteru su bile značajno niže, a srednje vrednosti clogP, Fa i P<sub>eff</sub> su bile značajno više od odgovarajućih srednjih vrednosti u zbirnom setu. Kao što se može videti na slikama 20 i 21 lekovite supstance iz ovog klastera se većinom nalaze u kvadrantu  $\gamma$ , koji je definisan P<sub>eff</sub> vrednostima većim od 2,5 x 10<sup>-4</sup> cm/s i Fa vrednostima većim od 85%. PSA vrednosti ovih lekovitih supstanci su bile manje od 67,4, a HB vrednosti manje od 7. Takođe se može primetiti

da je 17 lekovitih supstanci iz klastera 2 bilo iz seta podataka B. Klaster 3 je sadržao samo atovakvon zbog izuzetno visoke D/S (5000000) i niske Fa vrednosti (6%).

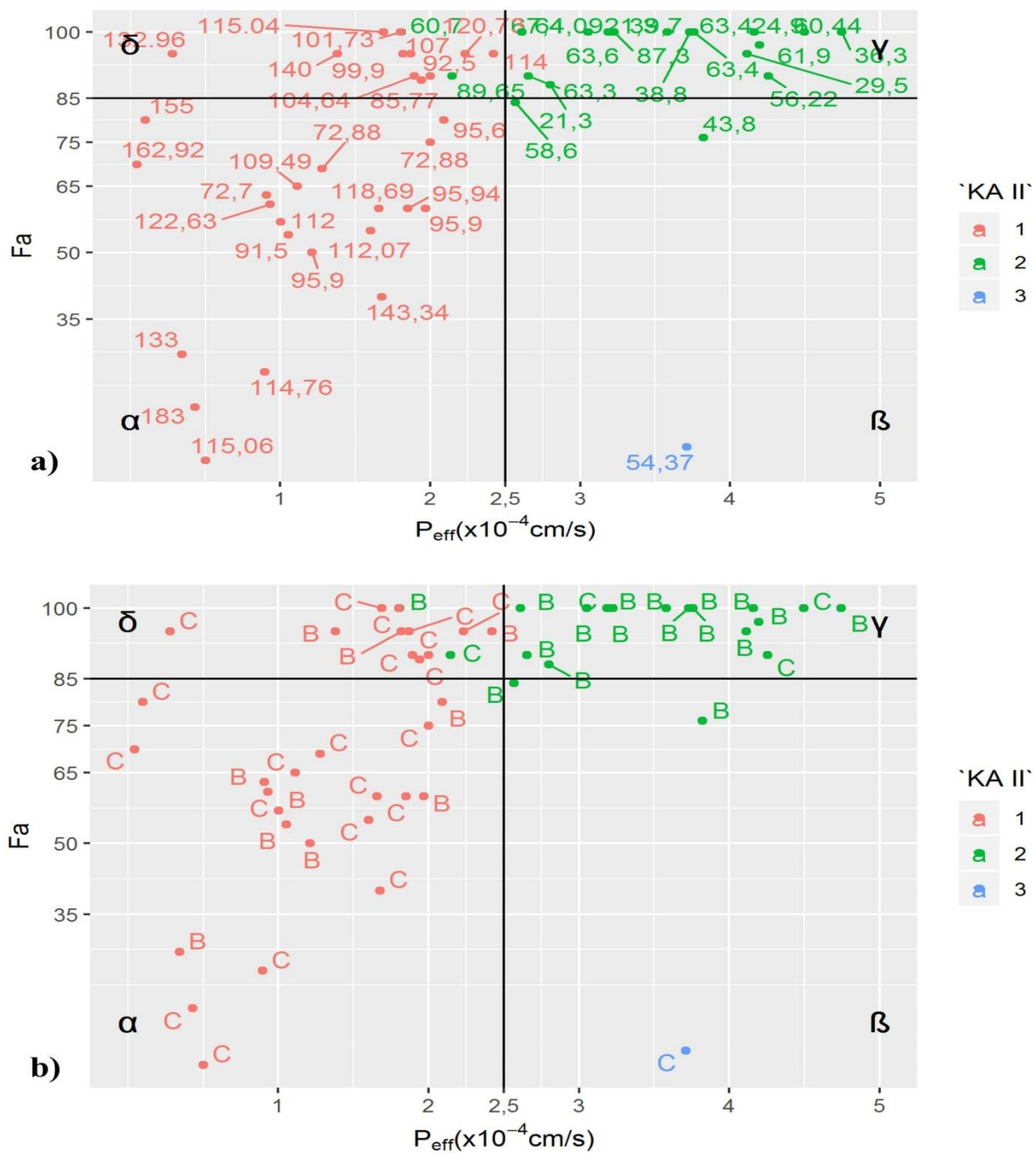


Slika 19. Grafički prikaz rezultata klaster analize I i klasifikacionih analiza zbirnog seta podataka B i C; oznake podataka se odnose na pripadnost lekovite supstance setu podataka B ili C

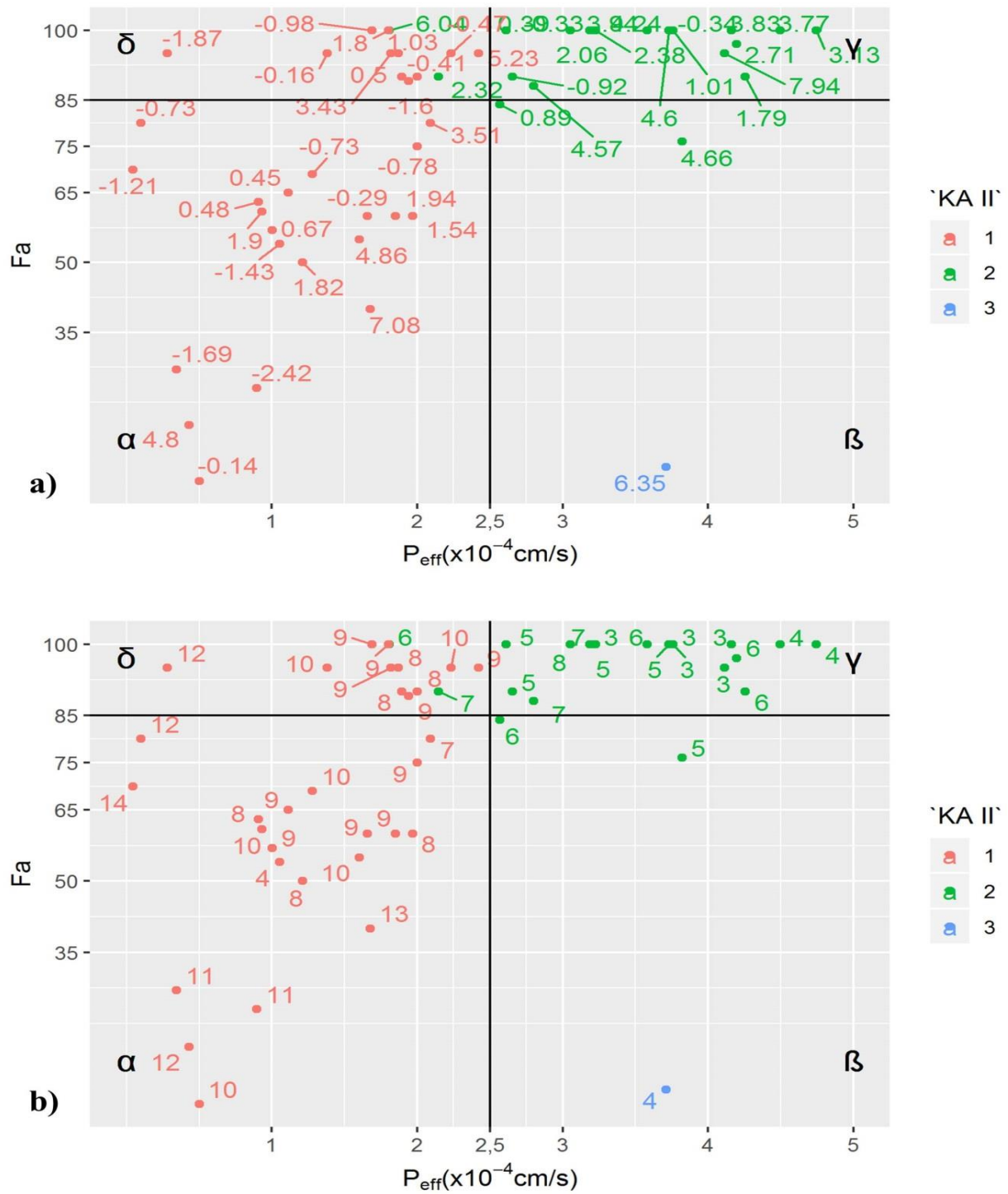
Klaster analizom II (KA II) su dobijena tri klastera. Trideset i jedna lekovita supstanca je grupisana u klaster 1 na osnovu vrednosti PSA, HB, clogP, Fa i  $P_{eff}$ . Srednje vrednosti PSA i HB u ovom klasteru su bile značajno više, dok su srednje vrednosti clogP, Fa i  $P_{eff}$  bile značajno niže od odgovarajućih srednjih vrednosti u setu B. Za svaku od najznačajnijih varijabli pojedinačno su pomoću klasifikacione analize definisane granične vrednosti. Na slikama 20 i 21, koje predstavljaju grafički prikaz rezultata klaster analize II (KA II) i klasifikacionih analiza, se može uočiti da se većina lekovitih supstanci iz ovog klastera nalazi u kvadrantu  $\alpha$ , koji je definisan  $P_{eff}$  vrednostima manjim od  $2,5 \times 10^{-4}$  cm/s i Fa vrednostima manjim od 85%. PSA vrednosti ovih lekovitih supstanci su bile veće od 72,7, a HB vrednosti manje od 7. Većina supstanci sa  $P_{eff}$  vrednostima manjim od  $2,5 \times 10^{-4}$  cm/s su imala niske clogP vrednosti. Takođe se može primetiti da je 21 lekovita supstanca iz klastera 1 bila iz seta podataka C. Prema *desc.var* izveštaju, 21 lekovita supstanca je grupisana u klaster 2 na osnovu vrednosti istog skupa varijabli (PSA, HB, clogP, Fa i  $P_{eff}$ ). Međutim, srednje vrednosti PSA i HB u ovom klasteru su bile značajno niže, a srednje vrednosti clogP, Fa i  $P_{eff}$  su bile značajno više od odgovarajućih srednjih vrednosti u zbirnom setu. Kao što se može videti na slikama 20 i 21 lekovite supstance iz ovog klastera se većinom nalaze u kvadrantu  $\gamma$ , koji je definisan  $P_{eff}$  vrednostima većim od  $2,5 \times 10^{-4}$  cm/s i Fa vrednostima većim od 85%. PSA vrednosti ovih lekovitih supstanci su bile manje od 67,4, a HB vrednosti manje od 7. Takođe se može primetiti da je 17 lekovitih supstanci iz klastera 2 bilo iz seta podataka B. Klaster 3 je sadržao samo atovakvon zbog izuzetno visoke D/S (5000000) i niske Fa vrednosti (6%).

U okviru klaster analize III (KA III) dobijena su tri klastera. Na osnovu vrednosti Fm, HB, PSA i clogP u klaster 1 i 2 grupisano je 28, odnosno 24 lekovite supstance, redom. Srednje vrednosti Fm i clogP lekovitih supstanci u klasteru 1 bile su niže, dok su srednje vrednosti HB i PSA bile više od srednjih vrednosti za zbirni set. Za svaku od najznačajnijih varijabli pojedinačno su pomoću klasifikacione analize definisane granične vrednosti. Na Slici 22, koja predstavlja grafički prikaz rezultata klaster analize III (KA III) i klasifikacionih analiza, se može uočiti da se većina lekovitih supstanci iz ovog klastera nalazi u kvadrantu  $\alpha$ , koji je definisan clogP vrednostima manjim od 1,5 i Fm vrednostima manjim od 50%. Većina supstanci iz ovog kvadranta imala niže HB i više PSA vrednosti u odnosu na supstance iz kvadranta  $\gamma$ . Dvadeset i dve lekovite supstance iz klastera 1 su iz seta podataka C. Klaster 2 je sadržao lekovite supstance sa višim vrednostima Fm i clogP i nižim vrednostima HB i PSA u poređenju sa srednjim vrednostima u setu. Na Slici 22 se vidi da se ove lekovite supstance pretežno nalaze u kvadrantu  $\gamma$ , koji je definisan clogP vrednostima većim od 1,5 i Fm vrednostima većim od 50%. 21 lekovita supstanca iz klastera 1 je bila iz seta podataka B. Zbog visokih PIK/D,  $C_{max}/D$  i  $t_{1/2}$  vrednosti, levotiroksin-natrijum je jedina lekovita supstanca u klasteru 3.

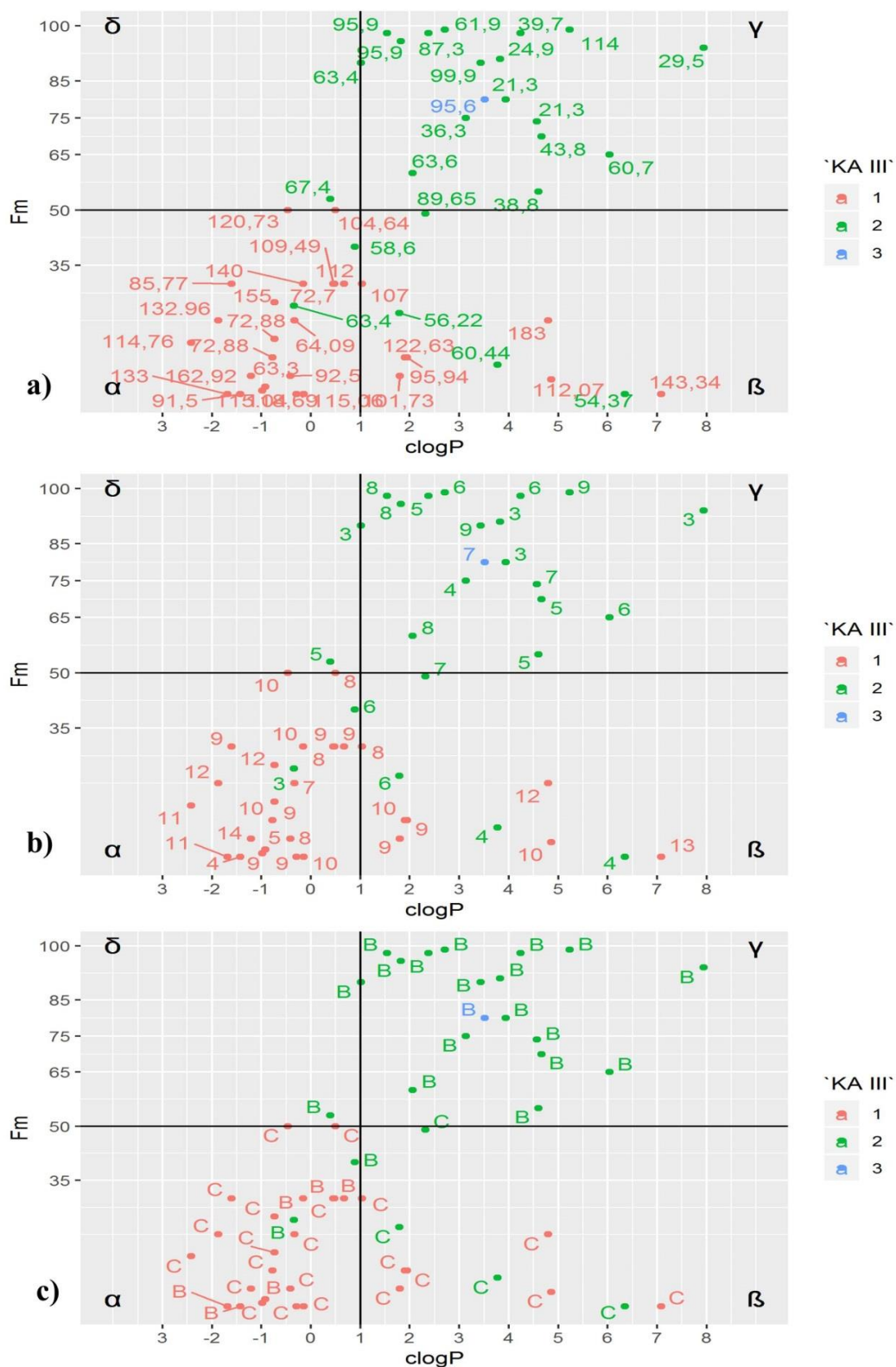




Slika 20. Grafički prikaz rezultata klaster analize II i klasifikacionih analiza zbirnog seta podataka B i C; oznake podataka se odnose na: a) PSA; i b) pripadnost lekovitih supstanci setu podataka B ili C

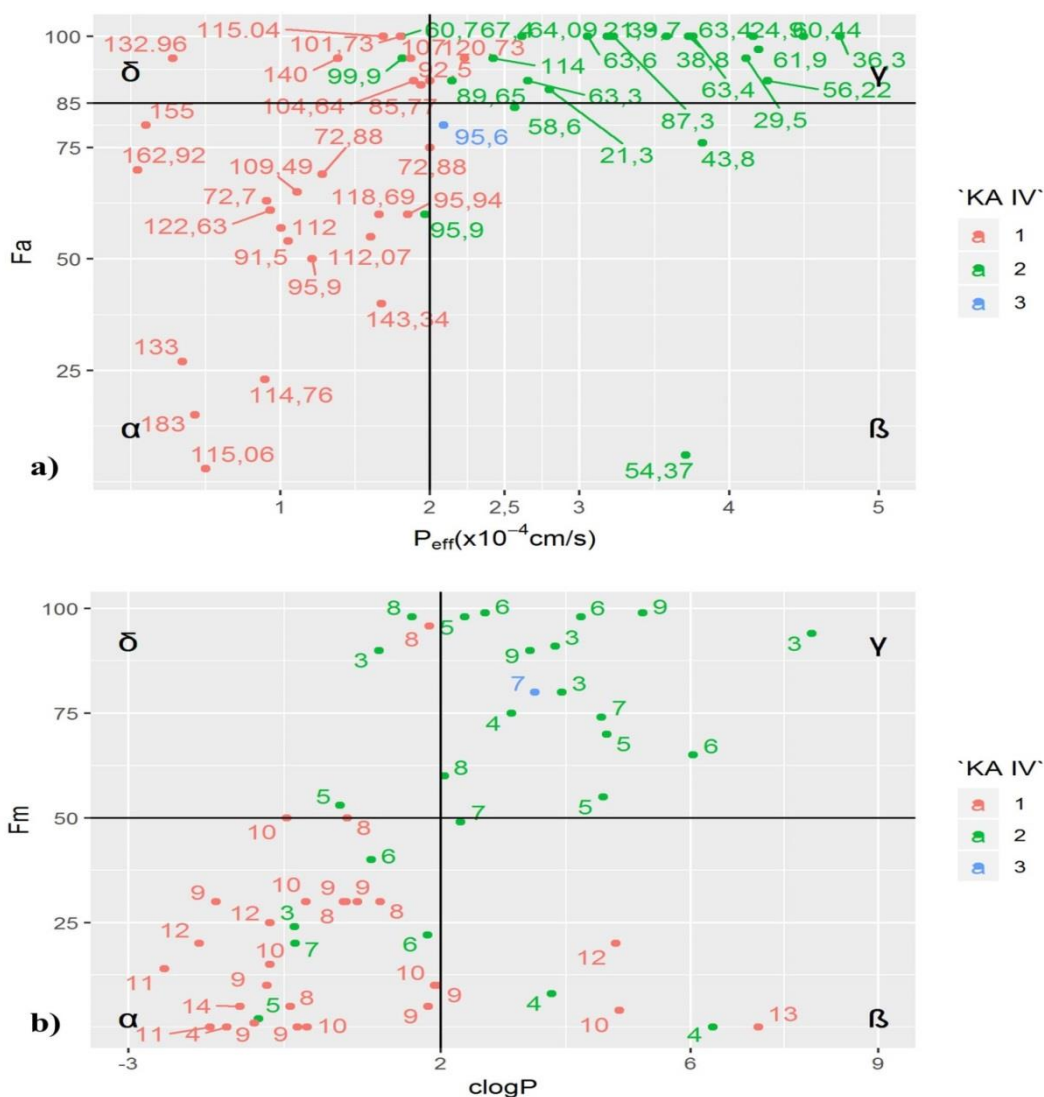


Slika 21. Grafički prikaz rezultata klaster analize II i klasifikacionih analiza zbirnog seta podataka B i C; oznake podataka se odnose na: a) clogP i b) HB

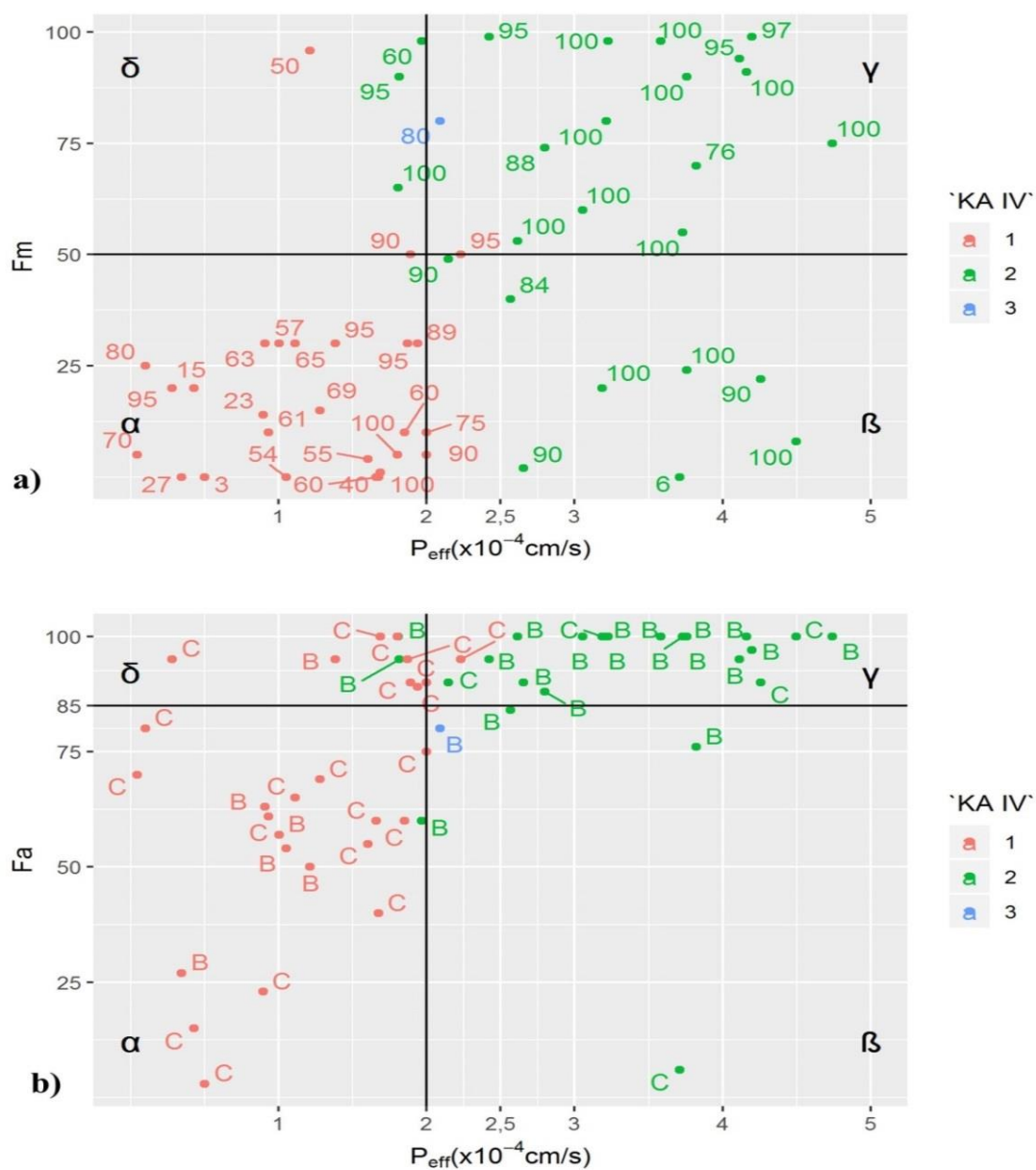


Slika 22. Grafički prikaz rezultata klaster analize III i klasifikacionih analiza zbirnog seta podataka B i C; oznake podataka se odnose na: a) TPSA, b) HB i c) pripadnost lekovitih supstanci setu podataka B ili C

Klaster analizom IV (KA IV) su takođe dobijena tri klastera. Dvadeset i sedam i dvadeset i pet lekovitih supstanci je grupisano u klastera 1 i 2, na osnovu vrednosti  $F_a$ ,  $P_{eff}$ ,  $F_m$ , HB, TPSA i  $clogP$ . Srednje vrednosti  $F_a$ ,  $P_{eff}$ ,  $F_m$  i  $clogP$  lekovitih supstanci u klasteru 1 su bile niže, dok su srednje vrednosti HB i TPSA bile više od srednjih vrednosti ovih parametara u zbornom setu. Za svaku od najznačajnijih varijabli pojedinačno su pomoću klasifikacione analize definisane granične vrednosti. Na slici 23, koja predstavlja grafički prikaz rezultata KA IV i klasifikacionih analiza, se može uočiti da se većina lekovitih supstanci iz ovog klastera nalazi u kvadrantu  $\alpha$ , koji je definisan  $clogP$  vrednostima manjim od 2,  $P_{eff}$  vrednostima većim od  $2 \times 10^{-4}$  cm/s i  $F_a$  i  $F_m$  vrednostima manjim od 85% i 50%, redom. Lekovite supstance iz klastera 1 su imale TPSA vrednosti veće od 72,9, dok za HB vrednosti postoje izvesna preklapanja između klastera, ali se ipak uočava da su ove vrednosti nešto više u odnosu na supstance iz klastera 2. Dvadeset i jedna lekovite supstanca iz klastera 1 je bila iz seta podataka C. Lekovite supstance u klasteru 2 sa imale niske TPSA i HB vrednosti i visoke  $F_a$ ,  $P_{eff}$ ,  $F_m$  i  $clogP$  vrednosti. Na slikama 23 i 24 se vidi da se ove lekovite supstance pretežno nalaze u kvadrantu  $\gamma$ , koji je definisan  $clogP$  vrednostima većim od 2,  $P_{eff}$  vrednostima većim od  $2 \times 10^{-4}$  cm/s i  $F_a$  i  $F_m$  vrednostima većim od 85% i 50%, redom. TPSA vrednosti većine lekovitih supstanci iz ovog kvadranta su bile niže od 68. Dvadeset lekovitih supstanci iz klastera 2 je bila iz seta podataka B. Levotiroksin-natrijum je, i u ovom slučaju bio jedini član klastera 3.



Slika 23. Grafički prikaz rezultata klaster analize IV i klasifikacionih analiza zbornog seta podataka B i C; oznake podataka se odnose na: a) TPSA; b) HB; c) pripadnost lekovitih supstanci setu podataka B ili C



Slika 24. Grafički prikaz rezultata klaster analize IV i klasifikacionih analiza zbirnog seta podataka B i C; oznake podataka se odnose na: a) TPSA, b) HB, c) Fa i d) pripadnost lekovitih supstanci setu podataka B ili C

Tabela 9. Rezultati klaster analiza za zbirni set B i C

lekovita supstanca	KA I (4 klastera)	KA II (3 klastera)	KA III (3 klastera)	KA IV (3 klastera)	BCS
atomoksetin	2	2	2	2	1
citalopram	2	2	2	2	1
desloratadin	2	2	2	2	1/2
dronabinol	2	2	2	2	2
fluoksetin- hidrohlorid	2	2	2	2	1
kalcitriol	2	2	2	2	2/4
klonazepam	2	2	2	2	2
lakosamid	2	2	2	2	1
levetiracetam	2	2	2	2	1
levotiroksin-natrijum	4	1	3	3	3
nikardipin	2	1	2	2	3
nizatidin	1	1	1	1	3
paroksetin	2	2	2	2	2
pregabalin	1	2	1	2	3
risperidon	2	2	2	2	2
triflusal	2	2	2	2	2/4
donepezil-hidrohlorid	2	2	2	2	2
brivaracetam	2	2	2	2	1
terbutalin	1	1	1	1	3
amlodipin	2	1	2	2	1
lizinopril	1	1	1	1	3
ranitidin	1	1	1	1	3
ramirpil	2	1	2	2	3
benazepril	1	1	2	1	3
loperamid-hidrohlorid	2	2	2	2	2
metformin- hidrohlorid	1	1	1	1	3
kaptopril	2	2	2	2	3
acetazolamid	1	1	1	1	4
aciklovir	1	1	1	1	4
amisulprid	1	1	1	1	4
atovakvon	3	3	2	2	4
azapropazon	2	2	2	2	4
kandesartan-cileksetil	1	1	1	1	4
cefprozil	1	1	1	1	4
ceftibuten	1	1	1	1	4
hlorotiazid	1	1	1	1	4
hlortalidon	1	1	1	1	4
ciprofloksacin-hidrohlorid	1	1	1	1	4
klodronska kiselina	1	1	1	1	4
enoksacin	1	1	1	1	4
eprosartan-mezilat	1	1	1	1	4
felbamat	2	1	1	1	4
fleroksacin	2	2	1	2	4



furosemid	1	1	1	1	4
lenalidomid	1	1	1	1	4
megestrol-acetat	2	2	2	2	4
nitrofurantoin	2	1	1	1	4
norfloksacin	1	1	1	1	4
fenoksimetil-penicilin	1	1	1	1	4
fenazopiridin- hidrohlorid	2	2	2	2	4
sulfisoksazol	1	1	1	1	4
valsartan	1	1	1	1	4
riboflavin	1	1	1	1	4

Rezultati sprovedenih klaster analiza su pokazali da su određene supstance zbog ekstremnih vrednosti predominantnih varijabli u procesu klasterovanja smeštene u odvojene klaster bez obzira na kombinaciju ulaznih varijabli korištenih u analizi. Dronabinol je prepoznat kao takva supstanca unutar grupe supstanci za koje je pokazana bioekvivalencija između čvrstog farmaceutskog oblika i rastvora (set B), a na osnovu visoke D/S vrednosti ( $D/S = 3571$ ), kao i levotiroksin-natrijum na osnovu visokih  $PIK/D$  i  $C_{max}/D$  vrednosti i dugog poluvremena eliminacije ( $t_{1/2} = 180$  h). Dronabinol se obimno metaboliše i ima nisku rastvorljivost/visoku permeabilnost i u skladu sa ovim osobinama je, kada je analiziran kao deo zbirnog seta, smešten u klaster 2 sa sličnim lekovitim supstancama. Levotiroksin-natrijum se, zbog svojih farmakokinetičkih osobina, izdvajao čak i kao deo zbirnog seta. U slučaju lekovitih supstanci koje su u literaturi opisane kao nisko rastvorljive/nisko permeabilne lekovite supstance (set C), atovakvon je izdvojen u poseban klaster na osnovu izuzetno visoke D/S vrednosti ( $D/S = 5 \times 10^6$ ). Uprkos prisustvu ovakvih supstanci, metodom hijerarhijskog klasterovanja na glavnim komponentama su uspešno identifikovane sličnosti između lekovitih supstanci i izvršeno je njihovo grupisanje. Ako se izuzmu klasteri sa pomenutim supstancama, lekovite supstance su u slučaju seta podataka B grupisane u dva klastera. Međutim, u slučaju seta C, lekovite supstance su grupisane u tri ili četiri klastera (kada se izuzmu klasteri sa samo jednom supstancom). Ovakvi rezultati ukazuju na veći nivo raznolikosti unutar grupe lekovitih supstanci koje pokazuju nisku rastvorljivost i nisku permeabilnost. Interesantno je da su klaster analize na zbirnom setu podataka rezultirale sa dva jasno definisana klastera bez obzira na to koja je kombinacija ulaznih varijabli primenjena. U slučaju klaster analize IV, kada su kao ulazni parametri korištene sve varijable (njih 11), levotiroksin-natrijum je identifikovan kao jedina supstanca, koja je odvojena u poseban klaster zbog niske doze ( $200 \mu\text{g}$ ) kojom su normalizovane  $PIK$  i  $C_{max}$  vrednosti.

Na grafičkim prikazima klaster analiza (Slike 12-24) je uočljivo da je većina lekovitih supstanci grupisana u dva kvadranta ( $\alpha$  i  $\gamma$ ), čije su granice definisane  $P_{eff}$  vrednostima  $2 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$  i  $F_a$  i  $F_m$  vrednostima 85%, odnosno 50%. Ovakvi podaci su u skladu sa opšteprihvaćenim klasama visoka/niska permeabilnost. Prisustvo lekovitih supstanci u kvadrantima  $\beta$  i  $\delta$  je rezultat odstupanja između njihovih  $P_{eff}$ ,  $F_a$  i  $F_m$  vrednosti, o čemu su detaljno diskutovali Chen and Yu (416). Oni su istakli da se u većini slučajeva može očekivati da lekovite supstance, koje imaju visok obim metabolizma, pokazuju i visoku apsorpciju. Međutim, neke lekovite supstance, koje se primarno apsorbuju putem aktivnog transporta, mogu da pokažu potpunu apsorpciju, ali nizak nivo metabolizma. O uzrocima neslaganja između  $P_{eff}$  i  $F_a$  je detaljno diskutovano u poglavlju 5.2.1.

Klaster analize na setu podataka B i zbirnom setu su ukazale i na vezu između  $F_m$  i  $\text{clogP}$  tj. lipofilnije lekovite supstance su imale i veći obim metabolizma na šta su ukazali i Hosey i saradnici (417). Takođe je uočeno da je većina lekovitih supstanci sa TPSA vrednostima manjim od 70 imala visoke  $F_a$  vrednosti. Palm i saradnici (23) su na osnovu rezultata regresione analize zaključili da se u slučaju lekovitih supstanci sa PSA vrednostima manjim od 60 može očekivati potpuna apsorpcija ( $F_a > 90\%$ ). Newby i saradnici (237) su pomoću metode klasifikacionih i regresionih stabala takođe pokazali da se za lekovite supstance sa niskim TPSA vrednostima može očekivati visoka apsorpcija.

Neke lekovite supstance koje su inicijalno pripadale različitim setovima su grupisane zajedno u analizama sprovedenim na zbirnom setu. Nizatidin, terbutalin, lizinopril, ranitidin, benazepril i metformin-hidrochlorid, za koje je pokazana bioekvivalencija između čvrstog farmaceutskog oblika i rastvora (set B) su grupisani sa nisko rastvorljivim/nisko permeabilnim lekovitim supstancama koje su generalno prepoznate kao “problematične” u pogledu oralne apsorpcije. Sa druge strane, atovakvon, azapropazon, fleroksacin, megestrol-acetat i fenazopiridin, koji su u literaturi opisani kao nisko rastvorljive/nisko permeabilne lekovite supstance, su grupisani sa supstancama sa “neproblematičnom” apsorpcijom. Međutim, većina lekovitih supstanci iz zbirnog seta su grupisane unutar odgovarajućih prvobitnih setova (B i C) što ukazuje na to da je *in vivo* ponašanje lekovitih supstanci usko povezano sa njihovim fizičko-hemijskim, biofarmaceutskim i farmakokinetičkim osobinama.

### 5.3. Modeli za predviđanje uticaja hrane na intestinalnu apsorpciju lekova

Za razvoj i validaciju modela za predviđanje uticaja hrane na intestinalnu apsorpciju lekova je korišten zbirni set podataka (set B i set C). Prema uticaju hrane na obim apsorpcije, lekovite supstance su klasifikovane u tri klase: klasa „pozitivan efekat“ (FE $\uparrow$ ), „negativan efekat“ (FE $\downarrow$ ) i „bez efekta“ (FE $\emptyset$ ) i pomoću desetostruke unakrsne validacije sa stratifikovanim uzorkovanjem su podeljene na set za učenje (training set) i set za proveru (test set) u odnosu 7:3. Sastav navedenih setova prikazan je u Tabelama 10 i 11, redom. S obzirom na to da je zbirni set podataka bio neuravnotežen u pogledu efekta hrane (sadržao je 34 lekovite supstance bez efekta hrane, 9 sa pozitivnim i 10 lekovitih supstanci sa negativnim efektom hrane na apsorpciju) u trening setu je pomoću *RandOverClassif* funkcije veštački utrostručen i učetvorostručen broj primera lekovitih supstanci sa pozitivnim i negativnim efektom hrane, redom (249).

Analize su prvobitno sprovedene primenom RF i SVMPoly funkcija na trening set sa dva farmakokinetička parametra ( $t_{1/2}$  i  $F_m$ ) i svim biofarmaceutskim ( $D/S$ ,  $F_a$  i  $P_{eff}$ ) i fizičko-hemijskim parametrima ( $clogP$ ,  $MW$ ,  $TPSA$  i  $HB$ ) kao ulaznim varijablama. Međutim, kada su dobijeni modeli primenjeni na test set, koji je sadržao 15 lekovitih supstanci, kappa vrednosti su bile ispod željenog nivoa od 0,4, koji je preporučen u literaturi za *in silico* klasifikacione modele (418, 419). Primenom *varImp* funkcije utvrđeno je da su u procesu klasifikacije učestvovala samo sledeće varijable:  $D/S$ ,  $P_{eff}$ ,  $F_m$  i  $t_{1/2}$ , te je uključivanje ostalih pet varijabli smanjilo prediktivnu moć klasifikacionih modela.

Analize su ponovljene primenom RF i SVMPoly funkcija na trening set sa  $D/S$ ,  $P_{eff}$ ,  $F_m$  i  $t_{1/2}$  kao ulaznim varijablama. RF parametri ( $n_{tree}$  i  $m_{try}$ ) su bili podešeni na 500 i 2. SVMPoly parametri (*degree*, *scale* i  $C$ ) su bili 1, 5 i 1. Kappa vrednosti za test set su bile 0,7521 za SVMPoly i 0,7345 za RF model što ukazuje na značajno slaganje između predviđenog i efekta hrane uočenog *in vivo*. Dok je preciznost u FE $\downarrow$  klasi bila 1 za oba modela, preciznost u FE $\emptyset$  klasi za SVMPoly model je bila veća od RF modela (1 naspram 0,9), dok je RF model pokazao veću preciznost u poređenju sa SVMPoly modelom u FE $\uparrow$  klasi (0,67 prema 0,5). Oba modela su omogućila uspešnu klasifikaciju devet od deset lekovitih supstanci, iz test seta, u FE $\emptyset$  klasu (osetljivost = 0,9), dve od dve lekovite supstance u FE $\uparrow$  klasu (osetljivost = 1) i dve od tri lekovite supstance u FE $\downarrow$  klasu (osetljivost = 0,67). Gu i saradnici (320) su dobili slične vrednosti za osetljivost po klasi kada su primenili model logističke regresije na set podataka od 92 lekovite supstance pri čemu su ulazne varijable bile maksimalna doza koja se može apsorbovati (engl. *Maximum absorbable dose*, MAD), dozni broj i  $\log D$ . Međutim, ove vrednosti su se odnosile na trening set, jer model nije testiran na eksternom, nezavisnom setu podataka.



Tabela 10. Set za učenje (trening set) za razvoj i validaciju modela za predviđanje uticaja hrane na intestinalnu apsorpciju lekova

lekovita supstanca	D/S	Fm	$P_{\text{eff}} (x 10^{-4} \text{ cm/s})$	$t_{1/2}$	Efekat hrane	Efekat hrane Ref.
<b>set B</b>						
amlodipin	50	90	1,82	35,8	FE0	(420)
atomoksetin	3,2	80	3,21	5,6	FE0	(310)
benazepril	3,6	95,8	1,21	0,63	FE0	(421)
brivaracetam	0,1	90	3,76	9,13	FE0	(422)
klacitriol	0,2	65	1,81	5,94	FE0	(358)
kaptopril	0,63	40	2,57	2,2	FE↓	(423)
klonazepam	20	98	3,23	37,9	FE0	(359)
dronabinol	3571	94	4,11	3,52	FE↑	(424)
fluoksetin-hidrohlid	1,4	74	2,80	21,9	FE0	(304)
levetiracetam	0,7	24	3,76	7,4	FE0	(425)
lizinopril	0,1	0	0,34	21	FE0	(426)
loperamid-hidrohlid	4	70	3,82	14	FE0	(427)
metformin-hidrohlid	1,7	0	1,05	6	FE↓	(428)
nikardipin	20	99	2,42	2,08	FE0	(429)
nizatidin	7	30	1,38	1,37	FE0	(430)
pregabalin	9,3	2	2,65	5,6	FE0	(353)
ranitidin	0,3	30	1,00	2,89	FE0	(431)
terbutalin	0,1	30	0,91	14	FE↓	(432)
triflusal	900	60	3,05	0,5	FE0	(433)
<b>set C</b>						
acetazolamid	351,5	1	1,69	6	FE0	(434)
aciklovir	550,4	14	0,90	2,9	FE0	(357)
amisulprid	370	5	1,80	12	FE↑	(435)
atovakvon	5000000	0	3,71	62,5	FE↑	(370)
cefprozil	9090,9	20	0,28	1,25	FE0	(436)
hlortiazid	1785,7	0	1,66	2	FE↑	(423)
hlortalidon	833,3	30	1,11	49	FE↑	(437)
ciprofloksacin-hidrohlid	7500	15	1,28	4	FE0	(402)
klodronska kiselina	2025,3	0	0,50	2,55	FE↓	(438)
enoksacin	149	30	1,94	5,2	FE0	(439)
fleroksacin	1157,7	20	3,19	10,3	FE0	(440)
lenalidomid	55,6	5	2,00	2,8	FE↓	(387)
nitrofurantoin	367,6	50	2,23	0,78	FE↑	(441)
norfloksacin	533,3	10	2,00	3,5	FE↓	(442)
fenoksimetil-penicilin	1600	10	1,85	0,52	FE↓	(423)
fenazopiridin-hidrohlid	363,6	49	2,15	9,61	FE0	(443)
sulfisoksazol	1515	30	1,87	4,15	FE0	(444)
valsartan	3200	4	1,60	6	FE0	(445)
riboflavin	666,7	25	0,10	2,97	FE↑	(446)

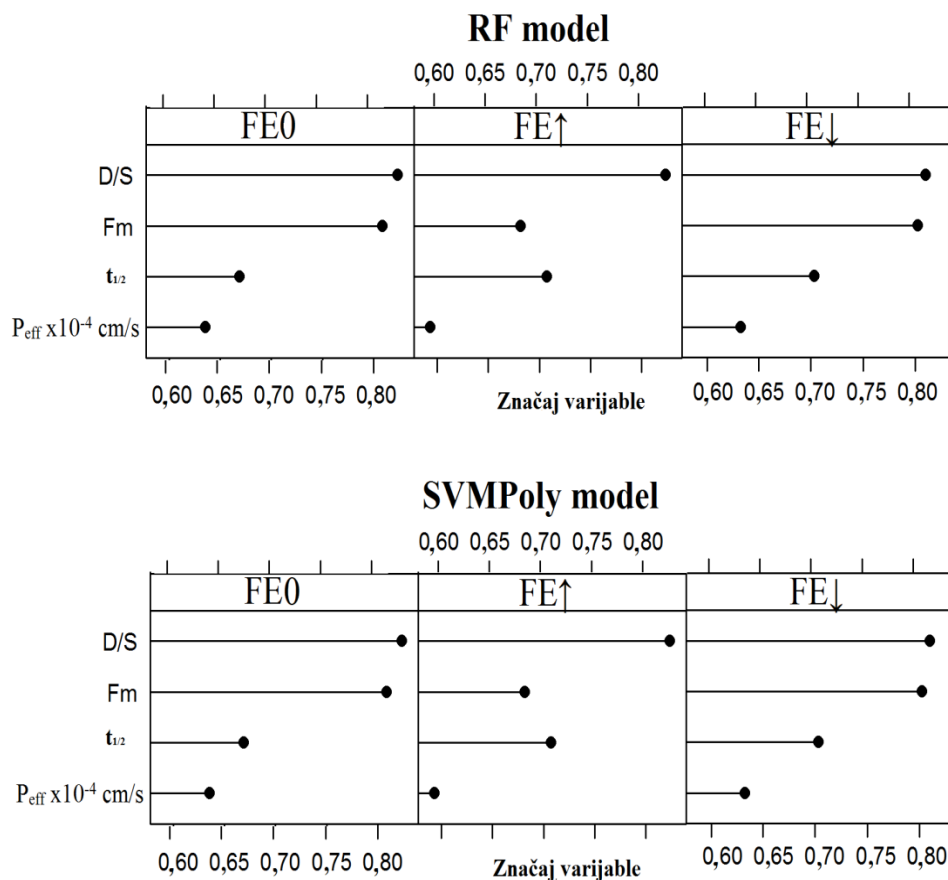
Tabela 11. Set za proveru (test set) za razvoj i validaciju modela za predviđanje uticaja hrane na intestinalnu apsorpciju lekova

lekovita supstanca	D/S	F <sub>m</sub>	P <sub>eff</sub> (x 10 <sup>-4</sup> cm/s)	t <sub>1/2</sub>	Efekat hrane Ref.	Efekat hrane	Predviđeno RF modelom	Predviđeno SVMPoly modelom
<b>set B</b>								
citalopram	0,6	75	4,74	33,55	<sup>(447)</sup>	FE0	FE0	FE0
desloratadin	227,3	91	4,16	26,8	<sup>(448)</sup>	FE0	FE0	FE0
donepezil-hidrohlorid	1	55	3,73	78,4	<sup>(449)</sup>	FE0	FE0	FE↑
lakosamid	6,7	53	2,61	12,5	<sup>(338)</sup>	FE0	FE0	FE0
levotiroksin-natrijum	4,7	80	2,09	180	<sup>(450)</sup>	FE↓	FE0	FE↑
paroksetin	4,8	98	3,58	16	<sup>(432)</sup>	FE0	FE0	FE0
ramirpil	0,3	98	1,97	14	<sup>(451)</sup>	FE0	FE0	FE0
risperidon	25	99	4,20	3,6	<sup>(452)</sup>	FE0	FE0	FE0
<b>set C</b>								
azapropazon	2222,2	22	4,26	14,3	<sup>(371)</sup>	FE↑	FE↑	FE↑
kandesartan-cileksetil	640	33	1,68	9,47	<sup>(453)</sup>	FE0	FE0	FE0
ceftibuten	5000	5	0,04	2,4	<sup>(300)</sup>	FE↓	FE↓	FE↓
eprosartan- mezilat	130,4	20	0,43	20	<sup>(454)</sup>	FE0	FE0	FE0
felbamat	857,1	50	1,89	19,1	<sup>(455)</sup>	FE0	FE↑	FE0
furosemid	3333,3	10	0,2	1,9	<sup>(456)</sup>	FE↓	FE↓	FE↓
megestrol-acetat	20000	8	4,50	32,6	<sup>(457)</sup>	FE↑	FE↑	FE↑

Da bi se ispitaio značaj svake od četiri ulazne varijable u procesu klasifikacije, tokom razvoja SVMPoly i RF modela je korištena grafička metoda za *varImp* funkciju u *caret* paketu. Na Slici 25 je dat grafički prikaz značaja varijabli u procesu klasterovanja pri čemu su varijable poredane, od vrha prema dole, od najznačajnije do najmanje značajne.

Značaj varijabli u procesu klasifikacije je bio sličan za FE0 i FE↓ klase. Dobijeni rezultati ukazuju na to da se efekat hrane verovatno neće ispoljiti kod lekovitih supstanci koje se obimno metabolišu, imaju nizak odnos doza/rastvorljivost, te kratko poluvreme eliminacije i visoku permeabilnost. Ovo je u skladu sa zapažanjem da hrana sa visokim udelom masti neće imati značajan uticaj na obim apsorpcije lekovitih supstanci iz BCS/BDDCS grupe 1 (99, 163, 193, 458). Međutim, kod nekih lekovitih supstanci sa visokim odnosom DS ne dolazi do promene u obimu apsorpcije kada se uzimaju sa hranom. Felbamat je jedna od takvih lekovitih supstanci, i, dok primenom RF modela nije dobijena ispravna klasifikacija, primenom SVMPoly modela je ispravno klasifikovan u FE0 (“bez efekta”) klasu. To je nisko rastvorljiva/visoko permeabilna lekovita supstanca i moglo bi se očekivati da prisustvo hrane utiče na njegovu apsorpciju usled povećana rastvorljivosti u intestinalnom lumenu (458). No, felbamat je slabo rastvorljiva slaba baza, koja bi mogla da precipitira u prisustvu hrane usled povećanja pH vrednosti u želucu što bi dalje dovelo do smanjene bioraspoloživosti (459). Lekovite supstance sa niskim ili visokim odnosom D/S, koje se slabo metabolišu i imaju nisku permeabilnost i kratko poluvreme eliminacije, su, pomoću oba modela, klasifikovane u FE↓ (“negativan efekat”) klasu. Međutim, nijedan od dva razvijena modela nije ispravno klasifikovao levotiroksin-natrijum. Razlog za nepravilnu klasifikaciju ove lekovite supstance je njegoova visoka, *in silico* predviđena permeabilnost. Levotiroksin je lipofilna molekula. Međutim, visoko polarna cviter-jonska priroda bočnog lanca alanina sprečava prolazak molekule kroz hidrofobnu unutrašnjost lipidnog dvosloja ćelijske membrane, što ima za posledicu njegovu nisku permeabilnost (460). Lekovite supstance iz klase F↑ (“pozitivan efekat”) su imale visok odnos D/S, visoku permeabilnost i obim metabolizma. Wu i saradnici (163) i Custudio i saradnici

(458) su zaključili da je porast u obimu apsorpcije BDDCS grupe 2 lekovitih supstanci verovatno posledica kombinacije povećanja rastvorljivosti lekovitih supstanci u tankom crevu i inhibicije efluks transportera.



Slika 25. Značaj ispitivanih varijable koje su korištene za razvoj SVMPoly i RF modela (varijable su poređane od najznačajnijih ka najmanje značajnim za proces klasifikacije)

Oba modela (SVMPoly i RF) su relativno uspešno predvideli efekat hrane za test set sa 15 lekovitih supstanci. Razvijeni modeli su dalje korišteni za predviđanje efekta hrane za revidirani set podataka A (Tabela 12) iz kojeg je isključeno 18 lekovitih supstanci. Naime, terbutalin, furosemid, ranitidin, metformin-hidrohlorid, lizinopril, acetazolamid, levetiracetam, ciprofloksacin-hidrohlorid i aciklovir su isključeni jer su deo zbirnog seta podataka, koji je korišten za razvoj i validaciju modela. Kodein-fosfat, amodiakvin-hidrohlorid, kinin, valaciklovir i enalaprilat su isključeni, jer u okviru dostupne literature nisu pronađeni podaci o uticaju hrane na njihovu apsorpciju. Uticaj hrane na apsorpciju bisoprolol-fumarata, efavirenca, etambutol-dihidrohlorida i ribavirina takođe nije razmatran zbog nepouzdanosti podataka o permeabilnosti o čemu je prethodno diskutovano. Sastav revidiranog seta podataka A sa 46 lekovitih supstanci je prikazan u Tabeli 12. Kappa vrednosti, dobijene za ovaj set lekovitih supstanci, su bile 0,37 (SVMPoly) i 0,48 (RF). Dakle, samo kappa vrednost za RF model je bila iznad 0,4 (418, 419) tj. slaganje između predviđenog i očekivanog tj. stvarnog efekta hrane na intestinalnu apsorpciju lekovitih supstanci je bilo umereno. Preciznost SVMPoly modela za FE0, FE↑ i FE↓ klase je bila 0,77, 0,60 i 0,44, dok su odgovarajuće vrednosti osetljivosti bile 0,8, 0,33 i 0,6. Dakle, sposobnost SVMpoly modela da ispravno klasifikuje lekovite supstance sa pozitivnim efektom hrane (FE↑ klasa) nije bila zadovoljavajuća tj. šest od devet lekovitih supstanci nisu bile ispravno klasifikovane (Tabela 12).

U slučaju RF modela, preciznost za FE0, FE↑ i FE↓ klase je bila 0,83, 0,51 i 0,67, dok su odgovarajuće vrednosti osetljivosti bile 0,81, 0,56 i 0,67. Metoprolol i propranolol su primenom RF modela klasifikovani u FE0 klasu zbog njihove visoke permeabilnosti i obima metabolizma i niskog

D/S odnosa. Međutim, kliničke studije su pokazale da prisustvo hrane značajno povećava obim apsorpcije za obe lekovite supstance. Liedholm i saradnici (461) su sugerisali da je jedan od mehanizama, kojim hrana može povećati biorasploživost propranolola, kratkotrajna inhibicija njegove presistemske primarne konjugacije. Melander i saradnici (462) su istakli da bi redukcija presistenskog metabolizma mogla, takođe, da bude razlog za povećanu biorasploživost metoprolola u prisustvu hrane. Naproksen, piroksikam, ketoprofen, ibuprofen i diklofenak-natrijum su, primenom RF modela, klasifikovani u FE↑ klasu, dok prema dostupnim kliničkim podacima, prisustvo hrane ne utiče na obim apsorpcije ovih lekovitih supstanci. Ovo su nisko rastvorljive/visoko permeabilne lekovite supstance i bilo bi za očekivati da hrana ima pozitivan efekat na njihovu apsorpciju usled povećanja njihove rastvorljivosti u tankom crevu. Međutim, naproksen i ketoprofen imaju vrlo visoku permeabilnost ( $\geq 6,7 \times 10^{-4}$  cm/s), te zbog toga promene u njihovoj rastvorljivosti ne utiču na apsorpciju, jer visoka permeabilnost kompenzuje nisku rastvorljivost (164). Primenom RF modela takođe nisu ispravno klasifikovani L-dopa i  $\alpha$ -metildopa u FE0 klasu. No, njihov obim apsorpcije je smanjen kada se uzimaju sa obrokom, jer amino kiseline iz hrane mogu da spreče ulazak ovih lekovitih supstanci u enterocite kompeticijom za iste transportere (423). Primenom RF modela hidrohloriazid je klasifikovan u FE↓ (“negativan efekat”) klasu. Dostupni klinički podaci o uticaju hrane na apsorpciju ove lekovite supstance su kontradiktorni. Beerman i Groschinsky-Grind (463) su pokazali povećanu apsorpciju kada je hidrohloriazid primenjen sa hranom u dozi od 75 mg. Sa druge strane, rezultati studije koju su sprovedli Barbhaiya i saradnici (464) su pokazali značajno smanjenje u obimu apsorpcije kada je hidrohloriazid primenjen sa hranom u dozi od 50 mg.

Tabela 12. Revidirani set podataka A sa rezultatima predviđanja uticaja hrane primenom razvijenih modela

lekovita supstanca	D/S*	Fm*	$P_{\text{eff}}$ ( $\times 10^{-4}$ cm/s)*	$t_{1/2}$ *	Efekat hrane Ref.	Efekat hrane	Predviđeno RF modelom	Predviđeno SVMPoly modelom
amjodaron	555,6	80	0,9	25	(465)	FE↑	FE↑	FE0
amoksisilin	140,9	25	0,3	1,7	(466)	FE0	FE0	FE↓
antipirin	9,7	50	5,7	12	(467)	FE0	FE0	FE0
atenolol	4	10	0,2	6	(468)	FE↓	FE↓	FE↓
karbamazepin	781,3	75	4,3	15	(469)	FE↑	FE↑	FE0
cefaleksin	279,3	90	1,6	0,9	(470)	FE0	FE0	FE0
cimetidin	133,3	25	0,3	2	(471)	FE0	FE0	FE↓
digoksin	217,4	20	0,3	40	(423)	FE0	FE0	FE0
enalapril-maleat	4	70	1,6	11	(472)	FE0	FE0	FE0
feksofenadin	24	5	0,11	12	(318)	FE↓	FE↓	FE↓
fluvastatin- natrijum	2,7	90	2,4	2,7	(473)	FE0	FE0	FE0
griseofulvin	33333,3	20	6,3	16	(423)	FE↑	FE↑	FE↑
hidrohloriazid	71	0	0,04	11	(463)	FE↑	FE↓	FE↓
isotretinoin	8000	95	0,99	14	(474)	FE↑	FE↑	FE0
ketoprofen	576,9	90	8,7	1,8	(475)	FE0	FE↑	FE0
L-dopa	151,5	90	3,4	1,4	(423)	FE↓	FE0	FE0

losartan	250	97	1,15	2	(469)	FE0	FE0	FE0
metoprolol	5,9	90	1,5	3	(462)	FE↑	FE0	FE0
naproksen	71428,57	95	8,5	14	(476)	FE0	FE↑	FE0
oksprenolol	1,3	95	2,5	1,5	(477)	FE0	FE0	FE0
paracetamol	21,1	95	4	2	(478)	FE0	FE0	FE0
piroksikam	909,1	95	6,7	48	(479)	FE0	FE↑	FE↑
propranolol	0,6	90	2,9	4	(461)	FE↑	FE0	FE0
talinolol	94	1	0,3	10	(272)	FE↓	FE↓	FE↓
terbutalin	0,02	30	0,3	14	(318)	FE↓	FE↓	FE0
verapamil-hidrochlorid	10,9	70	6,8	4	(480)	FE0	FE0	FE0
α-metildopa	25	50	0,1	1,8	(423)	FE↓	FE0	FE0
amilorid	1	0	1,6	8	(481)	FE↓	FE↓	FE↓
hlorokvin-fosfat	3	50	3,98	984	(482)	FE↑	FE0	FE↑
diklofenak-natrijum	41666,67	99,5	3,73	1,1	(483)	FE0	FE↑	FE0
levofloksacin	3,75	5	2,82	7	(484)	FE0	FE0	FE↓
pirazinamid	23,15	96	3,56	9	(283)	FE0	FE0	FE0
stavudin	0,53	21,3	2,37	1,3	(485)	FE0	FE↓	FE↓
amitriptilin-hidrochlorid	0,15	75	4,53	22	(486)	FE0	FE0	FE0
metronidazol	43,1	80	3,26	8,5	(487)	FE0	FE0	FE0
prednizon	312,5	90	2,13	3,6	(488)	FE0	FE0	FE0
flukonazol	28,94	11	2,87	32	(288)	FE0	FE0	FE↑
metoklopramid-hidrochlorid	236,41	80	1,64	5	(489)	FE0	FE0	FE0
lamivudin	1,92	30	2,06	6	(490)	FE0	FE0	FE0
acetilsalicilna kiselina	63,29	90	3,47	0,2 5	(290)	FE0	FE0	FE0
hinidin-sulfat	88,49	90	3,66	2	(491)	FE0	FE0	FE0
ibuprofen	21052,63	99	4,03	2	(492)	FE0	FE↑	FE0
zidovudin	16,09	75	1,99	1,1	(493)	FE0	FE0	FE0
izoniazid	1,96	80	2,61	2	(494)	FE0	FE0	FE0
nifedipin	1724,14	99	2,59	2,5	(495)	FE0	FE0	FE0
meflokvin-hidrochlorid	606,79	6	1,29	480	(295)	FE↑	FE↑	FE↑
prednizolon	205,76	99	1,92	2,8	(496)	FE0	FE0	FE0

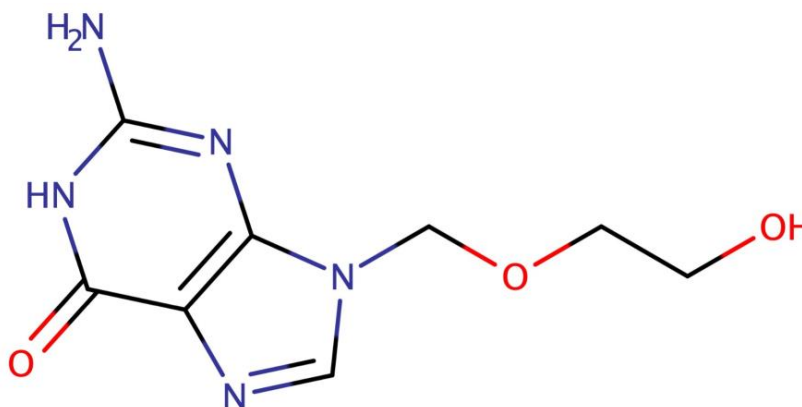
\* $t_{1/2}$  vrednosti lekovitih supstanci su preuzete iz reference (497) osim za prednizolon (496), a Fm vrednosti iz referenci (307, 324) osim za hlorokvin-fosfat, levofloksacin, stavudin, metronidazol, flukonazol, lamivudin, hinidin-sulfat, meflokvin-hidrochlorid, nifedipin i izoniazid, čije su Fm vrednosti preuzete redom iz sledeći referenci; (288, 295, 301, 482, 484, 485, 487, 490, 491)

## 5.4. Biofarmaceutska karakterizacija lekovitih supstanci koje pokazuju nisku rastvorljivost i nisku permeabilnost

Biofarmaceutski sistem klasifikacije je široko prihvaćen kao naučni okvir za predviđanje apsorpcije lekova, izbor pristupa razvoju formulacije u skladu sa karakteristikama lekovite supstance i potrebom za poboljšanjem njene biološke raspoloživosti, kao i regulatornu procenu postregistracionih izmena/varijacija i biološke ekvivalentnosti preparata. BCS grupa 4 obuhvata lekovite supstance koje pokazuju nisku rastvorljivost/nisku permeabilnost, za koje se navodi da pokazuju nisku i varijabilnu apsorpciju, visok stepen intra- i interindividualne varijabilnosti i značajan uticaj hrane koji takođe može doprineti varijabilnoj biološkoj raspoloživosti oralno datog leka (163, 498, 499). Brojni autori ukazuju na to da bi apsorpcija lekovitih supstanci koje pokazuju nisku rastvorljivost i nisku permeabilnost nakon oralne primene preparata bila upitna (163, 498, 500). Takođe, rezultati novijih studija ukazuju na ternernu klasifikaciju lekovitih supstanci, zasnovanu, pre svega, na njihovoj permeabilnosti. U skladu sa navedenim, sprovedena je detaljna analiza podataka koji se odnose na biofarmaceutska svojstva četiri izabrane model supstance (aciklovir, furosemid, valsartan i norfloksacin) koje se u literaturi opisuju kao nisko rastvorljive/nisko permeabilne. Na osnovu dostupnih literaturnih podataka, primenom modela razvijenih u ovom istraživanju, predviđena je permeabilnost, kao i potencijalni uticaj hrane za ispitivane model supstance. U okviru biofarmaceutske karakterizacije izabranih model supstanci ispitan je uticaj “pojednostavljenih” fiziološki zasnovanih medijuma koji simuliraju uslove u gastrointestinalnom traktu u preprandijalnom, odnosno postprandijalnom stanju na brzinu rastvaranja lekovite supstance iz komercijalnih uzoraka tableta sa trenutnim oslobađanjem. Takođe su razvijeni i validirani fiziološki zasnovani farmakokinetički modeli koji omogućavaju uvid u kinetiku i obim apsorpcije ispitivanih lekovitih supstanci nakon oralne primene preparata u uslovima na gladno i nakon obroka.

### 5.4.1. Aciklovir

Aciklovir je sintetički purinski nukleozidni analog, strukturno sličan gvaninu (Slika 26). Koristi se u tretmanu i profilaksi infekcija uzrokovanih *herpes simplex* virusom tip 1 i 2 i *varicella zoster* virusom. Doza aciklovira za oralnu primenu zavisi od indikacije. Kod tretmana primarne infekcije *herpes simplex* virusom, uključujući i genitalni herpes, uobičajna doza je 200 mg pet puta dnevno u trajanju od pet do deset dana. Uobičajna doza aciklovira kod tretmana vodenih ospica je 800 mg četiri do pet puta dnevno u trajanju od pet do sedam dana; kod herpes zoster se doza od 800 mg može uzimati pet puta dnevno u trajanju sedam do deset dana (318).



2-amino-9-(2-hidroksi-etoksimetil)-1H-purin-6-on

Slika 26. Strukturna formula i hemijski naziv aciklovira

### *Fizičko-hemijske i biofarmaceutske karakteristike*

Aciklovir pokazuje amfifilna svojstva sa jednom kiselom i jednom slabo baznom grupom u strukturi, čije su pKa vrednost 2,27 i 9,25, redom (501). Većina podataka u literaturi se odnosi na rastvorljivost na sobnoj temperaturi (22-25 °C), koja se kreće od 0,8 do 1,6 mg/ml (45, 502), dok se za rastvorljivost u vodi na 37 °C navodi vrednost od 2,5 mg/ml (501). Shojaei i saradnici (303) su pokazali da rastvorljivost aciklovira na 37 °C varira sa promenom pH vrednosti medijuma i eksperimentalno su određene sledeće vrednosti rastvorljivosti; 3,57 mg/ml (pH 2,54), 3,40 (pH 3,02), 2,63 (pH 4,52), 2,35 (pH 5,81), 2,51 (pH 7,13) i 3,55 (pH 9,04).

Particioni koeficijent (logP) aciklovira je -1,8 na 25 °C (45, 169), te se može zaključiti da se radi o izrazito hidrofilnoj lekovitoj supstanci. U studiji *in situ* intestinalne perfuzije na pacovu je izmerena jejunalna permeabilnost aciklovira od  $0,46 \times 10^{-4}$  cm/s što je značajno manje od permeabilnosti metoprolola ( $0,83 \times 10^{-4}$  cm/s), koji je u ovoj studiji korišten kao referentni standard za visoku permeabilnost (503). U skladu sa navedenim rezultatima, aciklovir je u okviru regulatorne smernice ICH M9 naveden kao primer nisko permeabilne lekovite supstance (18).

Bergstrom i saradnici (169) su na osnovu vrednosti za rastvorljivost u vodi na 25 °C, koja je eksperimentalno određena pomoću standardne "shake-flask" metode, i vrednosti za permeabilnost na Caco-2 ćelijama ( $1,2 \times 10^{-7}$  cm/s) okarakterisali aciklovir kao nisko rastvorljivu/nisko permeabilnu lekovitu supstancu. Arnal i saradnici (504) su zaključili da bi aciklovir trebalo klasifikovati u BCS grupu 4 ukoliko se pri razmatranju rastvorljivosti u obzir uzima doza od 800 mg, dok je za rastvaranje doza od 200 i 400 mg potrebno manje od 250 ml medijuma i u tom slučaju bi aciklovir pripadao BCS grupi 3.

$P_{\text{eff}}$  vrednost aciklovira predviđena pomoću *in silico* ANN modela razvijenog u okviru ovog istraživanja (poglavlje 5.2.1.) je bila  $0,9 \times 10^{-4}$  cm/s i prema rezultatima klasterovanja i klasifikacije (poglavlje 5.2.2.) grupisan je sa nisko permeabilnim lekovitim supstancama ( $P_{\text{eff}} < 1 \times 10^{-4}$  cm/s). Prema literaturnim podacima apsorpcija aciklovira nakon oralne primene je, kao posledica niske permeabilnosti, spora, varijabilna i nepotpuna i odvija se paracelularnim putem (504). Apsolutna bioraspoloživost nakon oralne primene se kreće od 10 do 20% (501). U literaturi se navodi da prisustvo hrane ne utiče značajno na brzinu i stepen apsorpcije aciklovira (504). Međutim, primenom RF modela za predviđanje uticaja hrane na intestinalnu apsorpciju lekova razvijenog u okviru ovog istraživanja (poglavlje 5.3.) aciklovir je klasifikovan u klasu FE↓ („negativan“ uticaj hrane) zbog njegove niske permeabilnosti i obima metabolizma i visokog odnosa D/S.

### *In vivo podaci*

U Tabeli 13 prikazane su vrednosti farmakokinetički parametara izračunate na osnovu rezultata *in vivo* studija nakon intravenske i oralne primene preparata aciklovira. Prikazani rezultati pokazuju da postoji relativno visok stepen proporcionalnosti između primenjene doze aciklovira i vrednosti  $C_{\text{max}}$  i  $PIK_{0-\infty}$  iako se u literaturi navodi da aciklovir ima uzak apsorpcioni prozor i delimično se apsorbuje putem influks transportera, koji se sa porastom doze zasite (504).

Tabela 13. Aciklovir-rezultati *in vivo* studija

Oznaka studije	Farmaceutski oblik leka	Doza (mg/kg <sub>i.v.</sub> , mg)	PIK <sub>0-∞</sub> (µg h/ml)	C <sub>max</sub> (µg/ml)	t <sub>max</sub> (h)	Broj ispitanika	Ref.
A	i.v. infuzija	0,5	4,27	1,45	/	3	(505)
		1	7,2	2,72	/	4	(505)
		2,5	10,09	3,35	/	2	(505)
B	i.v. infuzija	5	21,42	11,4	/	2	(506)
C	oralno-disperzibilna tableta	200	1,58	0,3	1,5	12	(507)
D	tableta	400	2,57	0,46	2	12	(508)
E	tableta	400	3,5	0,58	1,8	24	(509)
	suspenzija	400	3,78	0,54	1,51	25	(509)
F	tableta	800	7,69	1,1	2	36	(510)
	tableta (nakon obroka)	800	7,35	1,1	3	36	(510)

*In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja

*In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja aciklovira sprovedeno je za dva uzorka komercijalno dostupnih preparata tipa tableta sa dozvolom za lek u Bosni i Hercegovini koji sadrže 200 mg aciklovira. Sastav ispitivanih preparata prikazan je u Tabeli 14.

Tabela 14. Sastav ispitivanih tableta aciklovira

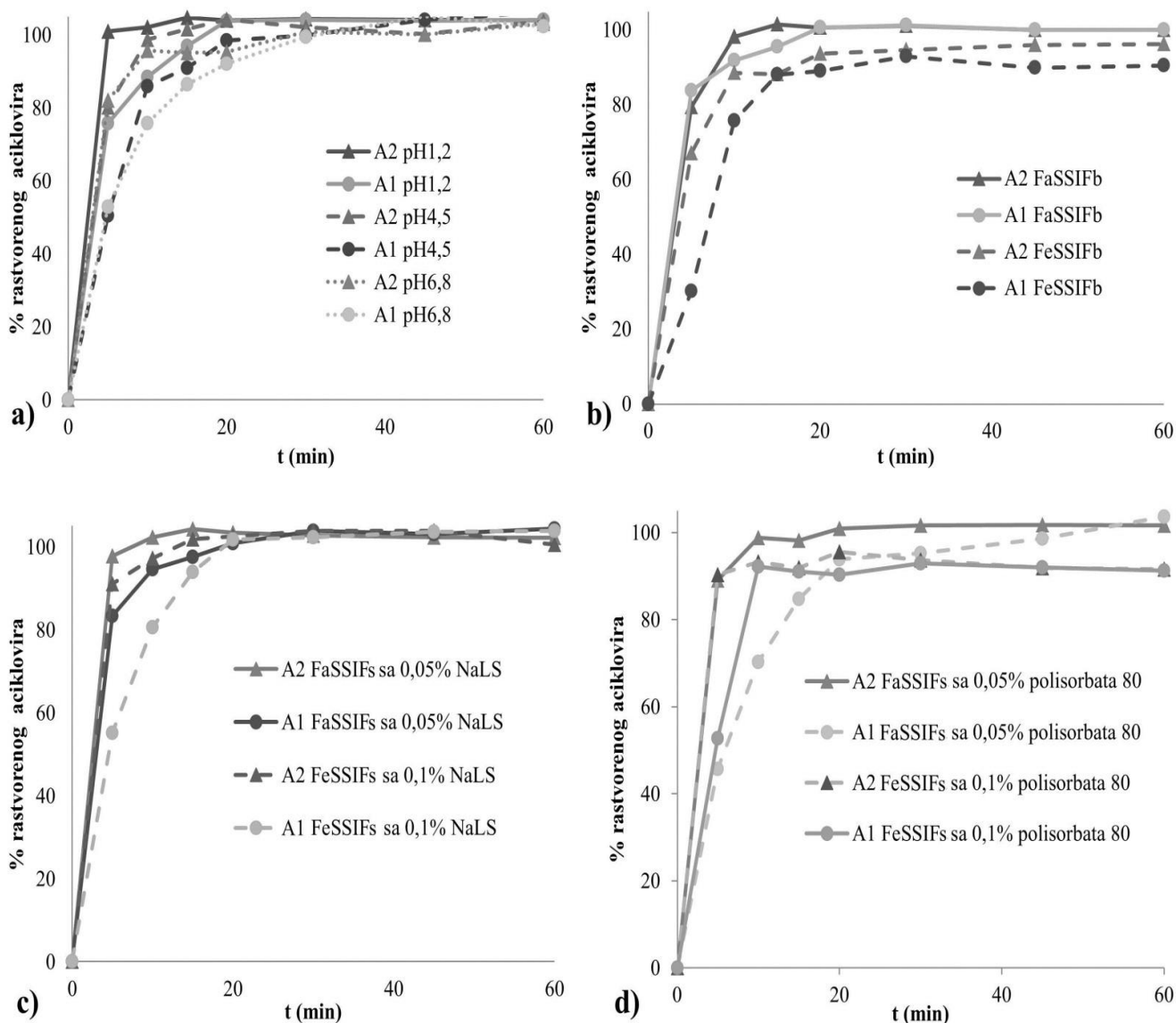
Uzorak A1	Uzorak A2
povidon natrijum-skrobglikolat mikrokristalna celuloza bezvodni silicijum-dioksid magnezijum-stearat hidroksipropilmetilceluloza titan-dioksid (E171). polietilenglikol 400 crveni željezo-oksidi (E 172) žuti željezo-oksidi (E 172)	laktoza-monohidrat kukuruzni skrob magnezijum-stearat

Uzorak A1 predstavlja film tablete, dok se u slučaju uzorka A2 radi o konvencionalnim neobloženim tabletama relativno jednostavnog sastava.

Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja aciklovira iz ispitivanih uzoraka tableta sa trenutnim oslobađanjem u različitim medijumima su prikazani na Slici 27. Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance iz tableta u medijumima pH 1,2, pH 4,5 i pH 6,8 pokazuju da tablete aciklovira ispunjavaju kriterijum za “veoma brzo rastvaranje” koji podrazumeva da je više od 85% lekovite supstance rastvoreno nakon 15 minuta (17). Ispitivanje brzine rastvaranja aciklovira iz tableta u tzv. “pojednostavljenim” fiziološki zasnovanim medijumima je pokazalo da je oslobađanje aciklovira iz oba preparata takođe bilo veoma brzo i potpuno u svim ispitivanim medijumima. Dobijeni rezultati pokazuju da pH vrednost i zapremina medijuma nisu značajno uticali na brzinu



rastvaranja aciklovira iz tableta što je bilo i očekivano uzimajući u obzir rastvorljivost aciklovira u fiziološkom opsegu pH vrednosti (303, 504).



Slika 27. Profili brzine rastvaranja aciklovira iz tableta u različitim medijumima: a) medijumi pH 1,2; pH 4,5; pH 6,8; b) *FaSSIFb* i *FeSSIFb*; c) "pojednostavljeni" fiziološki zasnovani medijumi sa NaLS; d) "pojednostavljeni" fiziološki zasnovani medijumi sa polisorbatom 80

## Razvoj i validacija PBPK modela

U Tabeli 15 prikazane su vrednosti ulaznih parametara koji su korišteni za razvoj PBPK modela za predviđanje *in vivo* ponašanja aciklovira nakon intravenske primene i oralne primene na gladno, odnosno nakon uzimanja obroka.

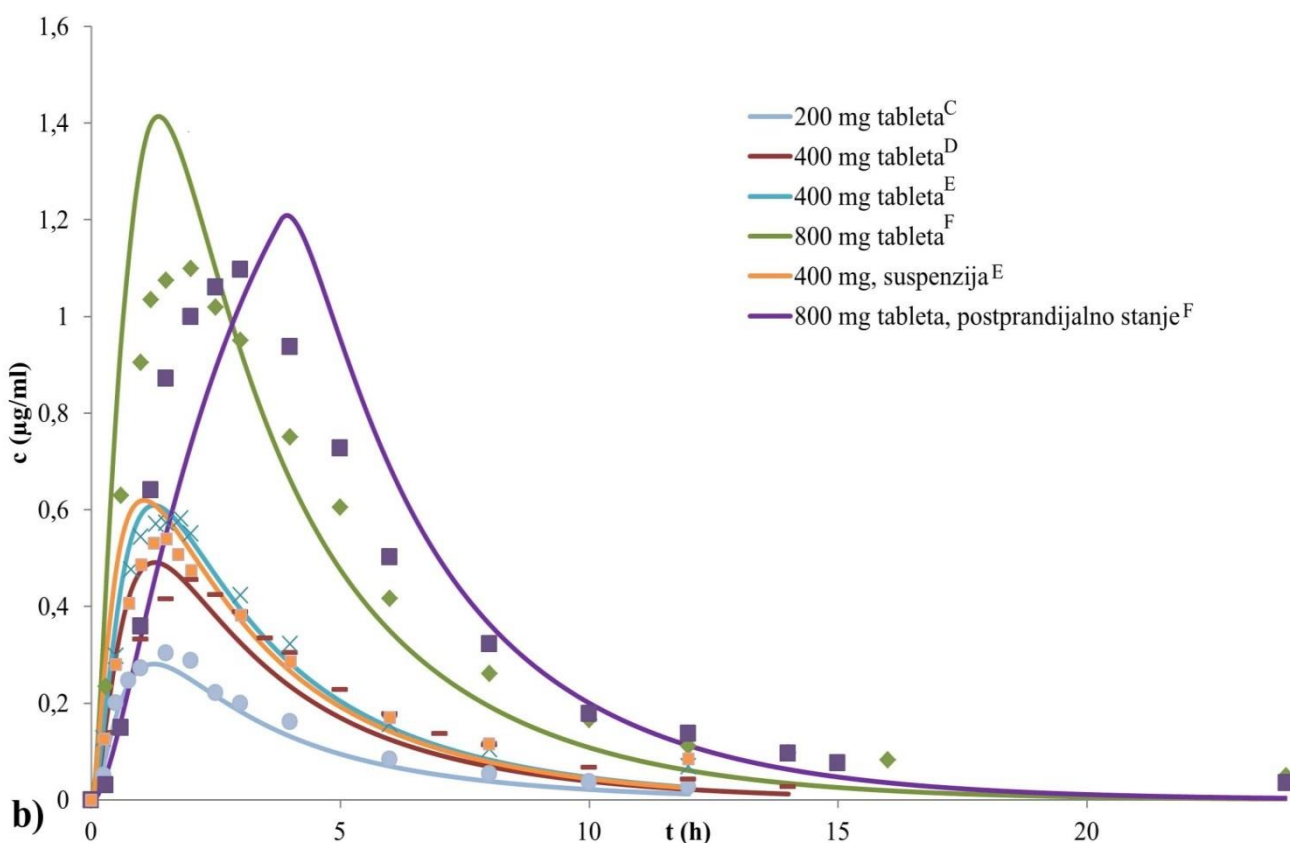
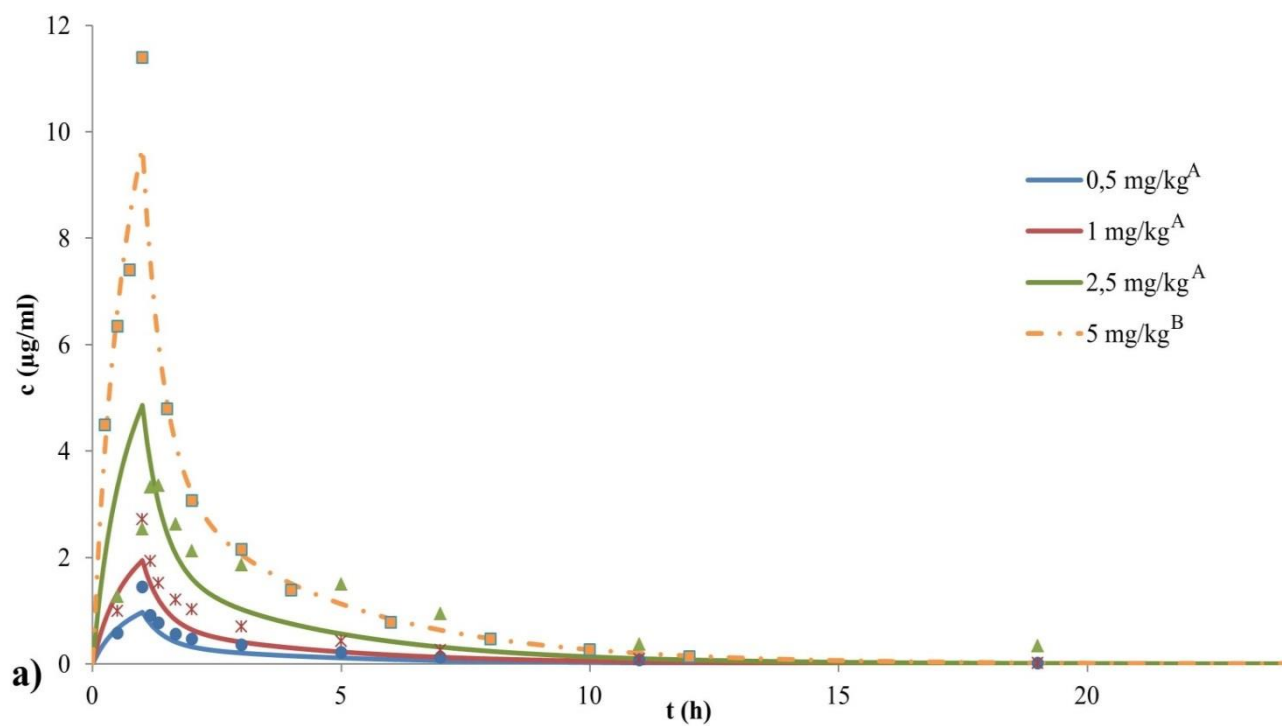
Kao što je već pomenuto, aciklovir pokazuje pH-zavisnu rastvorljivost u fiziološkom opsegu pH vrednosti, pa je prilikom razvoja modela kao ulazni parametar korišten i profil pH-zavisne rastvorljivosti ove lekovite supstance (303). Takođe, *in silico* je simuliran efekat žučnih soli na rastvorljivost i difuzioni koeficijent aciklovira (integrisana GastroPlus™ softverska opcija). S obzirom na to da se, prema literaturnim podacima, aciklovir primarno apsorbira paracelularnim putem (507) za razvoj modela je korištena paracelularna  $P_{\text{eff}}$  vrednost. Farmakokinetika aciklovira je u literaturi opisana dvoprostornim modelom (504).

Tabela 15. Ulazni parametri korišteni za razvoj PBPK modela aciklovira

Parametar	Vrednost
Molekulska masa (g/mol)	225,21
logP	-1,8 <sup>a</sup>
pKa	2,27; 9,25 <sup>b</sup>
Paracelularna $P_{\text{eff}}$ ( $\times 10^{-4}$ cm/s)	0,127 <sup>c</sup>
Oralne doze (mg)	200, 400, 800
Intravenske doze (mg/kg)	0,5, 1, 2,5, 5
Referentna rastvorljivost (mg/ml)	2,5 (pH 5,9) <sup>b</sup>
Srednje vreme precipitacije (s)	900 <sup>d</sup>
Koeficijent difuzije ( $\times 10^{-5}$ cm <sup>2</sup> /s)	0,8956 <sup>e</sup>
Gustina čestica lekovite supstance (g/ml)	1,54 <sup>f</sup>
Efektivni radijus čestica ( $\mu\text{m}$ )	25 <sup>e</sup>
Odnos koncentracije leka u krvi/plazmi	1 <sup>e</sup>
Slobodna frakcija leka u plazmi, $f_u$ (%)	84,6 <sup>g</sup>
Klirens, CL (l/h/kg)	0,238 <sup>h</sup>
Volumen distribucije, $V_c$ (l/kg)	0,228 <sup>h</sup>
Konstanta distribucije, $k_{1/2}$ (1/h)	1,31 <sup>h</sup>
Konstanta distribucije, $k_{2/1}$ (1/h)	0,8 <sup>h</sup>
Vreme simulacije (h)	24

<sup>a</sup>Vrednost preuzeta iz ref. (45); <sup>b</sup>Vrednost preuzeta iz ref. (501); <sup>c</sup>GastroPlus™ predviđena vrednost na osnovu radijusa molekula, koji je izračunat na osnovu molekulske mase, pomoću inkorporiranog Adson modela; <sup>d</sup>GastroPlus™ vrednost; <sup>e</sup>GastroPlus™ procenjena vrednost; <sup>f</sup>Vrednost preuzeta iz ref. (511); <sup>g</sup>Vrednost preuzeta iz ref. (512); <sup>h</sup>Vrednost preuzeta iz ref. (505)

Na osnovu izabranih ulaznih parametara model je predvideo profile koncentracije aciklovira u plazmi nakon intravenske primene i oralne primene na gladno, odnosno nakon uzimanja obroka, koji su prikazani na Slici 28. Sa ciljem validacije modela predviđeni profili su upoređeni sa profilima srednjih koncentracija aciklovira u plazmi dobijenim u okviru *in vivo* studija, koji su takođe prikazani na Slici 28. Prilikom razvoja modela postprandijalni uslovi su simulirani sa standardnim GastroPlus™ postavkama koje podrazumevaju obrok od 200,36 kcal i 30% masti i produženo vremena zadržavanja leka u želucu u odnosu na preprandijano stanje, kao posledicu primene obroka sa visokom kalorijskom vrednošću.

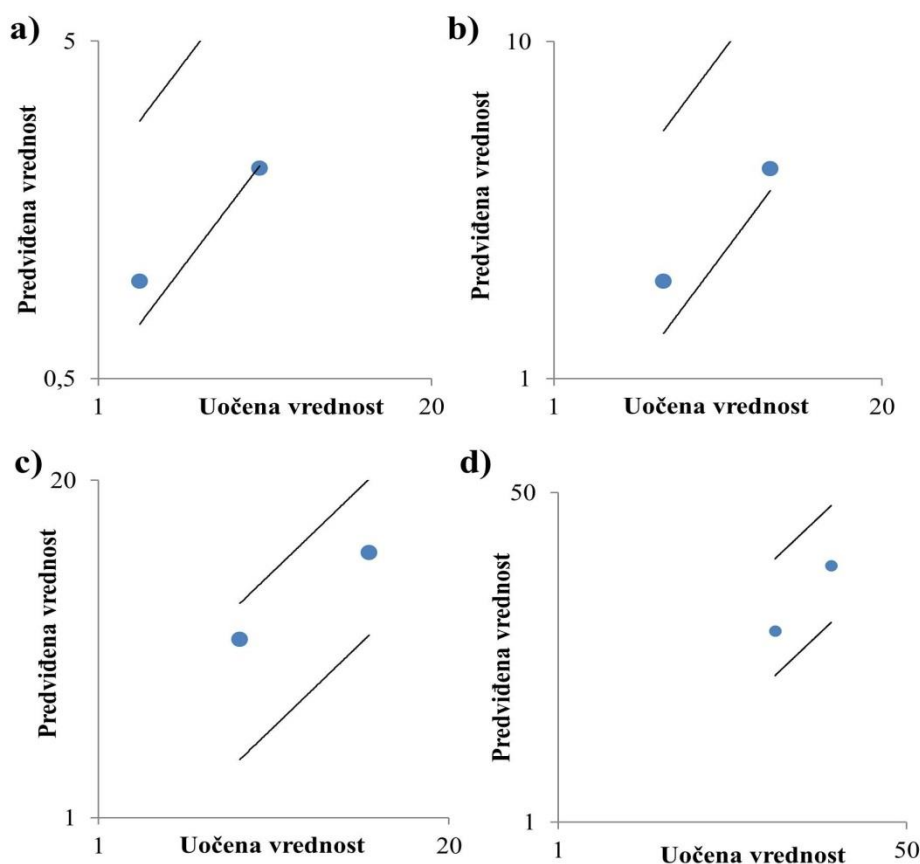


Slika 28. Predviđeni (linije) i *in vivo* (simboli) profili srednjih koncentracija aciklovira u plazmi nakon primene: a) infuzionog rastvora; b) različitih oralnih preparata

U Tabelama 16-18 i na slikama 29-31 prikazane su predviđene i *in vivo* uočene vrednosti farmakokinetičkih parametara nakon intravenske i oralne primene preparata aciklovira u preprandijalnim i postprandijalnim uslovima. Dobijene vrednosti greške predviđanja bile su u rasponu od 0,5 do 2 što je u skladu sa kriterijumom za validaciju PBPK modela koji je predložen u literaturi (256, 513).

Tabela 16. Poređenje predviđenih i *in vivo* uočenih vrednosti farmakokinetičkih parametara nakon intravenske primene aciklovira

	parametar	uočena vrednost ( <i>in vivo</i> )	predviđena vrednost ( <i>in silico</i> )	greška predviđanja
Studija A 0,5 mg/kg	$C_{max}$ (µg/ml)	1,45	0,97	0,67
	$PIK_{0-\infty}$ (µg h/ml)	4,27	2,09	0,49
Studija A 1 mg/kg	$C_{max}$ (µg/ml)	2,72	1,94	0,71
	$PIK_{0-\infty}$ (µg h/ml)	7,20	4,20	0,58
Studija A 2,5 mg/kg	$C_{max}$ (µg/ml)	3,35	4,86	1,45
	$PIK_{0-\infty}$ (µg h/ml)	10,09	10,50	1,04
Studija B 5 mg/kg	$C_{max}$ (µg/ml)	11,40	9,71	0,85
	$PIK_{0-\infty}$ (µg h/ml)	21,42	20,99	0,98



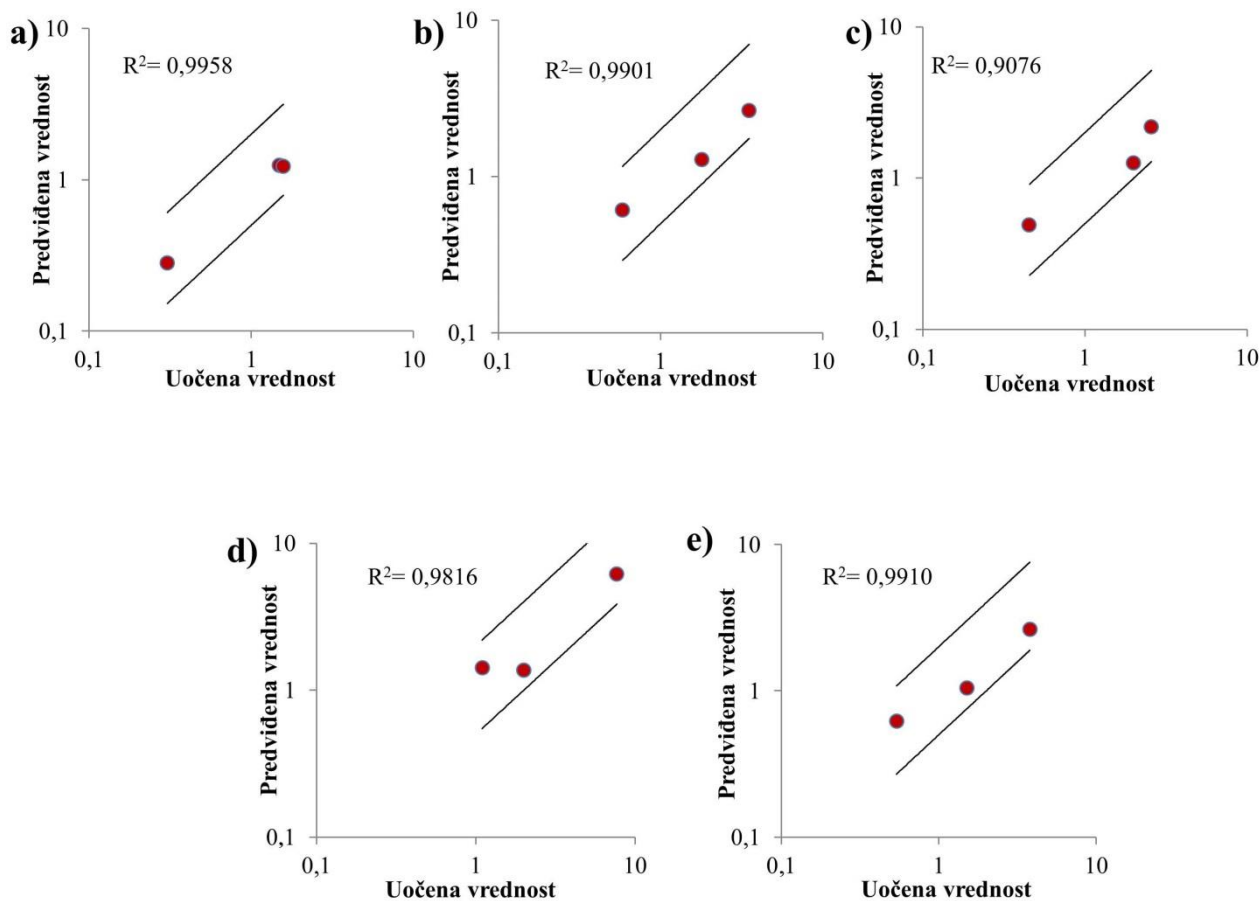
Slika 29. Poređenje predviđenih i *in vivo* uočenih farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$  i  $PIK_{0-\infty}$ ) nakon primene intravenske infuzije aciklovira: a) 0,5 mg/kg, b) 1 mg/kg, c) 2,5 mg/kg (Studija A); d) 5 mg/kg (Studija B)

Tabela 17. Poređenje predviđenih i *in vivo* uočenih vrednosti farmakokinetičkih parametara nakon oralne primene aciklovira pri preprandijalnim uslovima

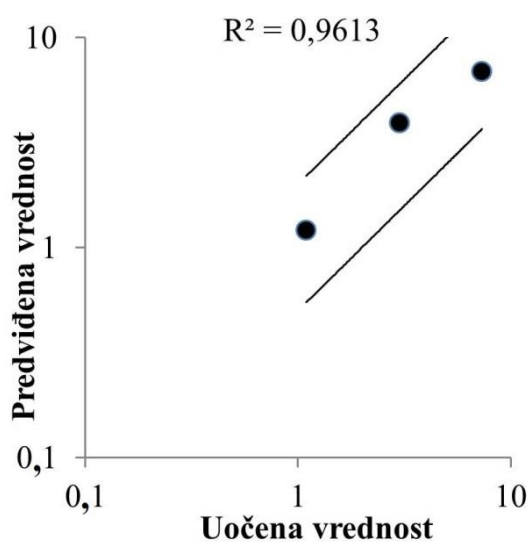
	parametar	uočena vrednost ( <i>in vivo</i> )	predviđena vrednost ( <i>in silico</i> )	greška predviđanja
<b>Studija C</b> 200 mg oralno-disperzibilna tableta	C <sub>max</sub> (µg/ml)	0,30	0,28	0,93
	t <sub>max</sub> (h)	1,50	1,24	0,83
	PIK <sub>0-∞</sub> (µg h/ml)	1,58	1,23	0,78
	Fa %	/	10,24	/
	F %	/	10,24	/
<b>Studija E</b> 400 mg tableta	C <sub>max</sub> (µg/ml)	0,58	0,61	1,05
	t <sub>max</sub> (h)	1,80	1,28	0,71
	PIK <sub>0-∞</sub> (µg h/ml)	3,50	2,65	0,76
	Fa %	/	10,34	/
	F %	/	10,34	/
<b>Studija D</b> 400 mg tableta	C <sub>max</sub> (µg/ml)	0,46	0,49	1,07
	t <sub>max</sub> (h)	2	1,26	0,63
	PIK <sub>0-∞</sub> (µg h/ml)	2,57	2,18	0,85
	Fa %	/	10,08	/
	F %	/	10,08	/
<b>Studija F</b> 800 mg tableta	C <sub>max</sub> (µg/ml)	1,10	1,41	1,28
	t <sub>max</sub> (h)	2	1,36	0,68
	PIK <sub>0-∞</sub> (µg h/ml)	7,69	6,15	0,80
	Fa %	/	10,10	/
	F %	/	10,10	/
<b>Studija E</b> 400 mg suspenzija	C <sub>max</sub> (µg/ml)	0,54	0,62	1,15
	t <sub>max</sub> (h)	1,51	1,04	0,69
	PIK <sub>0-∞</sub> (µg h/ml)	3,78	2,62	0,69
	Fa %	/	10,21	/
	F %	/	10,21	/

Tabela 18. Poređenje predviđenih i *in vivo* uočenih vrednosti farmakokinetičkih parametara nakon oralne primene tablete aciklovira pri postprandijalnim uslovima

	parametar	uočena vrednost ( <i>in vivo</i> )	predviđena vrednost ( <i>in silico</i> )	greška predviđanja
<b>Studija F</b> 800 mg tableta	C <sub>max</sub> (µg/ml)	1,1	1,21	1,10
	t <sub>max</sub> (h)	3	3,92	1,31
	PIK <sub>0-∞</sub> (µg h/ml)	7,35	6,87	0,93
	Fa %	/	10,66	/
	F %	/	10,66	/



Slika 30. Poređenje predviđenih i *in vivo* uočenih vrednosti farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-\infty}$ ) nakon oralne primene preparata aciklovira u uslovima na gladno: a) 200 mg tableta (Studija C); b) 400mg tableta (Studija E); c) 400 mg tableta (Studija D); d) 800 mg tableta (Studija F); e) 400mg suspenzija (Studija E)



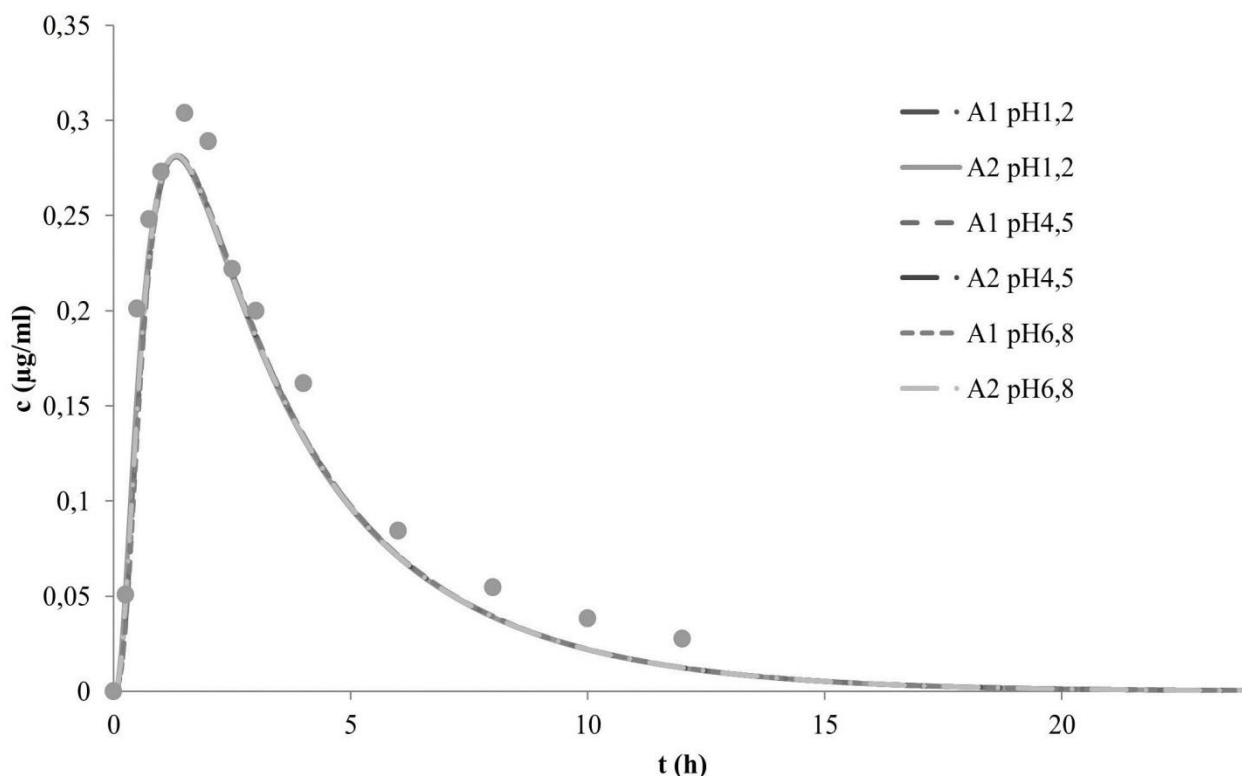
Slika 31. Poređenje predviđenih i *in vivo* uočenih vrednosti farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-\infty}$ ) nakon oralne primene tablete sa 800mg aciklovira u postprandijalnim uslovima (Studija F)

Analiza dobijenih rezultata ukazuje na visok stepen korelacije između predviđenih i *in vivo* uočenih vrednosti osnovnih farmakokinetičkih parametara (Slike 29-31), što ukazuje na visok stepen

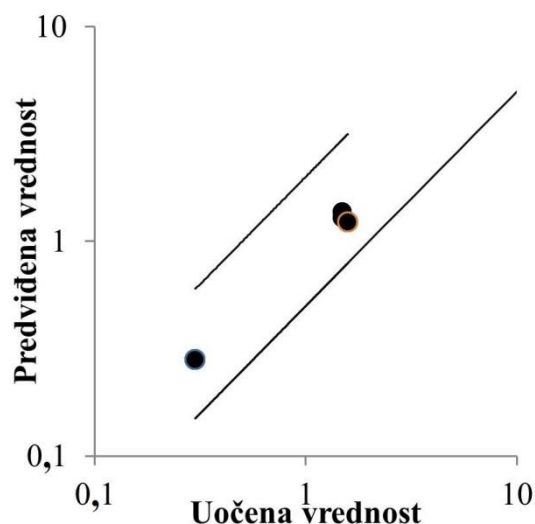
predviđanja postignut razvojem PBPK modela. Takođe, predviđene vrednosti za bioraspoloživost su bile približno 10% i za tablete i za suspenziju (Tabela 17), što je u skladu sa literaturnim podacima da se bioraspoloživost oralno primenjenog aciklovira kreće od 10 do 20% i da ne zavisi od farmaceutskog oblika leka (501). Rezultati simulacije ukazuju na to da hrana ne utiče na bioraspoloživost aciklovira.

#### Primena PBPK modela

Predviđeni profili koncentracije aciklovira u plazmi zasnovani na profilima brzine rastvaranja aciklovira iz ispitivanih uzoraka tableta u medijumima različitih pH vrednosti (1,2, 4,5 i 6,8), su prikazani na Slici 32. Kao što se može uočiti sa grafičkog prikaza, profili su međusobno podudarni što je očekivano s obzirom na to da su i profili brzine rastvaranja aciklovira iz tableta dobijeni u medijumima različitih pH vrednosti međusobno slični (oslobađanje aciklovira iz oba ispitivana preparata je bilo veoma brzo i potpuno). Predviđeni profili koncentracije aciklovira u plazmi su grafički prikazani uporedo sa *in vivo* profilom srednjih koncentracija aciklovira u plazmi nakon primene tablete od 200 mg u preprandijalnim uslovima (507) (Slika 32). Predviđene vrednosti farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-\infty}$ ) su bili u opsegu dvostrukog odstupanja od srednje vrednosti ovih parametara uočenih *in vivo* (Tabela 19, Slika 33). Dobijeni rezultati pokazuju da je primenom razvijenog PBPK modela moguće uspešno predvideti *in vivo* ponašanje aciklovira nakon oralne primene tableta u uslovima na gladno, kao i da se medijumi pH vrednosti 1,2, 4,5 i 6,8 mogu koristiti kao biorelevantni za ispitivanje brzine rastvaranja aciklovira iz konvencionalnih tableta u preprandijalnim uslovima.



Slika 32. Predviđeni profili koncentracije aciklovira u plazmi zasnovani na profilima brzine rastvaranja aciklovira iz komercijalno dostupnih tableta jačine 200 mg u medijumima različitih pH vrednosti i *in vivo* profil srednjih koncentracija aciklovira u plazmi nakon oralne primene u preprandijalnim uslovima (507). Simulirani profili se međusobno preklapaju



Slika 33. Poređenje vrednosti farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $PIK_{0-\infty}$  i  $t_{max}$ ) predviđenih na osnovu profila brzine rastvaranja aciklovira iz ispitivanih uzoraka tableta u medijumima različitim pH vrednosti i *in vivo* uočenih vrednosti ovih parametara nakon oralne primene aciklovira u uslovima na gladno (Studija C)

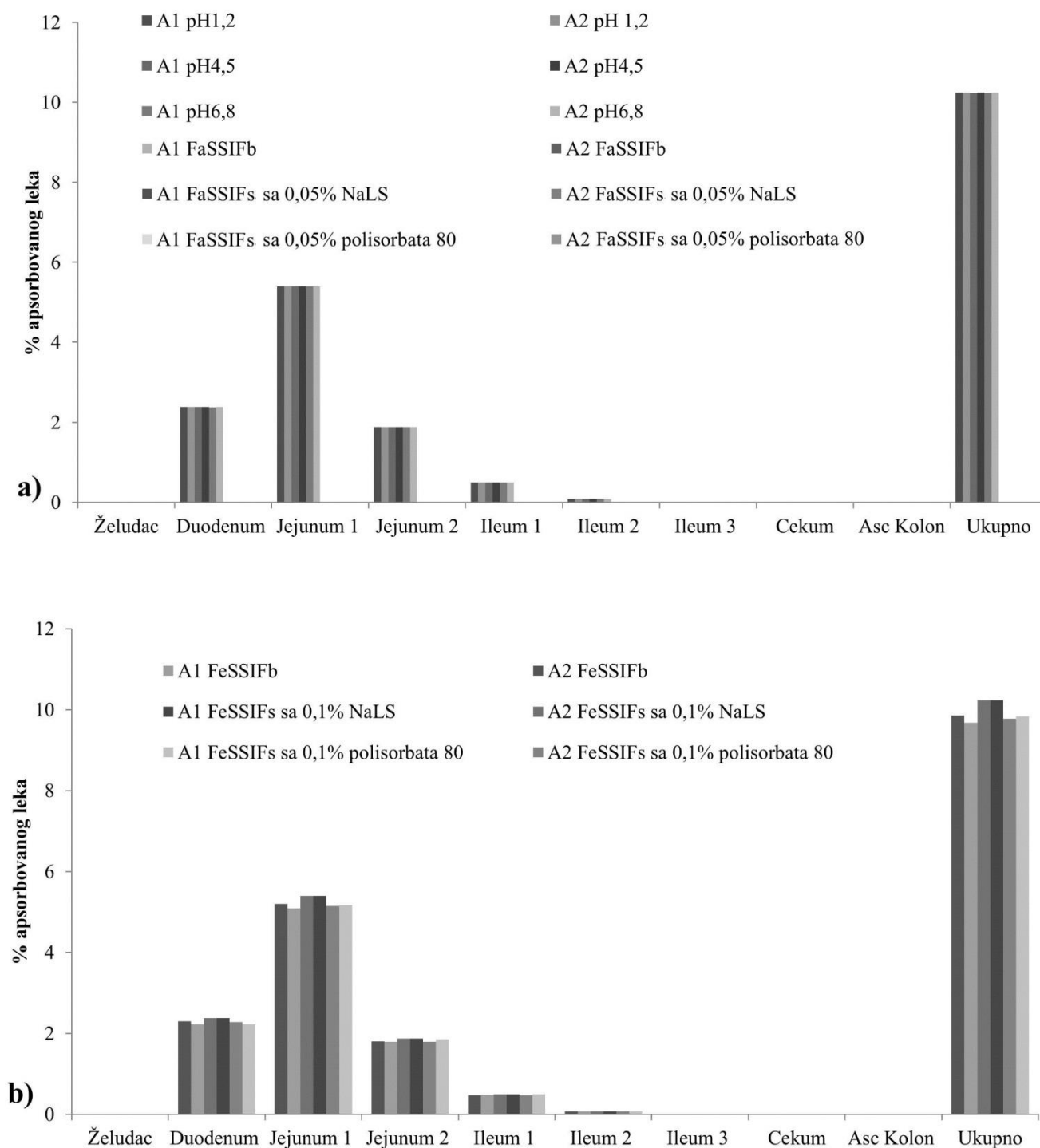
Tabela 19. Prikaz vrednosti farmakokinetičkih parametara predviđenih na osnovu profila brzine rastvaranja aciklovira iz ispitivanih uzoraka tableta u medijumima različitim pH vrednosti i vrednosti uočenih *in vivo* u preprandijalnim uslovima

Medijum	Parametar	Preparat	predviđena vrednost ( <i>in silico</i> )	srednja <i>in vivo</i> vrednost (opseg individualnih vrednosti)	greška predviđanja
pH 1,2	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	A1	0,28	0,30 (0,19-0,9) <sup>a</sup>	0,93
		A2			
pH 4,5		A1			
		A2			
pH 6,8		A1			
		A2			
pH 1,2	$t_{max}$ (h)	A1	1,36	1,5 <sup>a</sup>	0,91
		A2	1,28		0,85
pH 4,5		A1	1,36		0,91
		A2	1,36		0,91
pH 6,8		A1	1,36		0,91
		A2	1,28		0,85
pH 1,2	$PIK_{0-\infty}$ ( $\mu\text{g h/ml}$ )	A1	1,23	1,58 (0,8-2,9) <sup>a</sup>	0,78
		A2			
pH 4,5		A1			
		A2			
pH 6,8		A1			
		A2			
pH 1,2	F %	A1	10,24	10-20 <sup>b</sup>	/
		A2			
pH 4,5		A1			
		A2			
pH 6,8		A1			
		A2			

<sup>a</sup>vrednost se odnosi na *in vivo* profil srednjih koncentracija aciklovira u preprandijalnim uslovima preuzet iz ref. (507); <sup>b</sup>Vrednost preuzeta iz ref. (501)

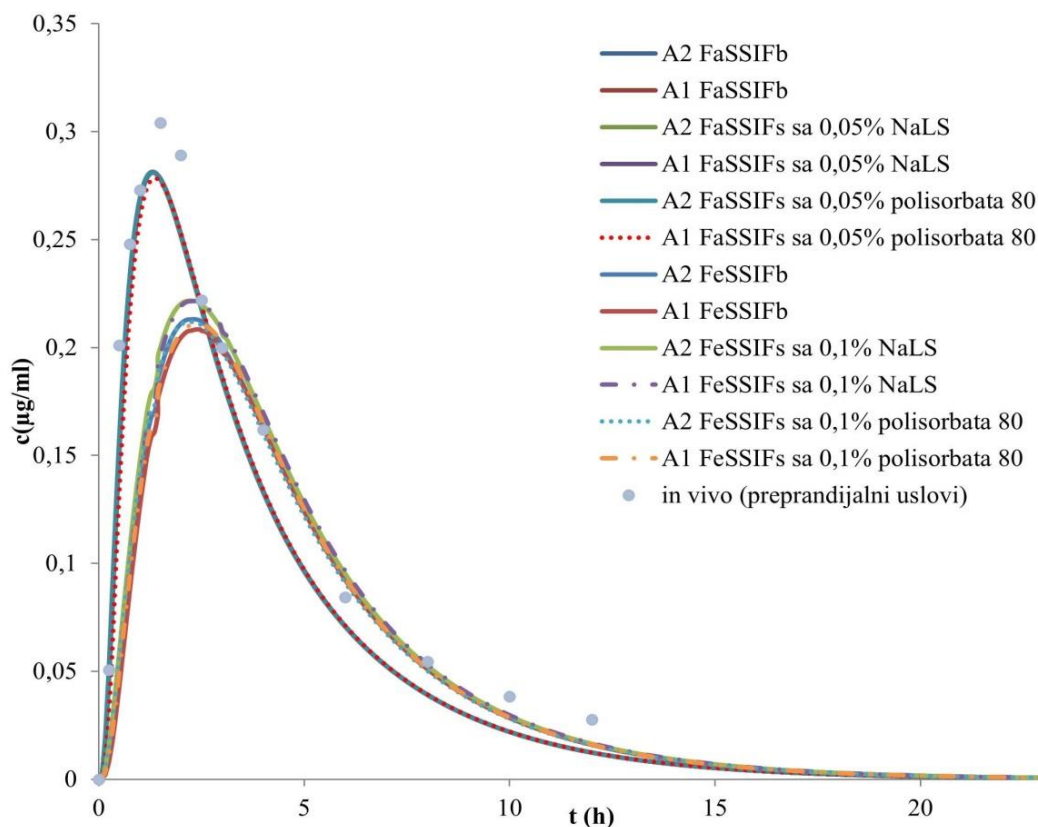


Predviđene vrednosti za bioraspoloživost leka su bile 10,24% (Tabela 19) što odgovara opsegu literaturnih vrednosti od 10-20% (501). Rezultati sprovedenih simulacija su pokazali da se najveći deo primenjene doze aciklovira (94,3% od ukupne količine apsorbovanog leka) apsorbuje u proksimalnom delu GIT-a (duodenum i jejunum) (Slika 34), što je u skladu sa podacima navedenim u literaturi (514, 515).



Slika 34. Procenat apsorbovanog aciklovira u različitim regionima GIT-a predviđen na osnovu profila brzine rastvaranja aciklovira iz ispitivanih uzoraka tableta u medijumima koji simuliraju uslove primene leka na gladno (a), odnosno nakon obroka (b)

Na Slici 35 su prikazani predviđeni profili koncentracije aciklovira u plazmi za preprandijalno i postprandijalno stanje, koji su zasnovani na profilima brzine rastvaranja aciklovira u “pojednostavljenim” fiziološki zasnovanim medijumima. Može se primetiti da su svi predviđeni profili za preprandijalno stanje međusobno slični kao što je i slučaj sa profilima brzine rastvaranja aciklovira iz analiziranih tableta (oslobađanje aciklovira iz obe analizirane formulacije je bilo veoma brzo i potpuno).



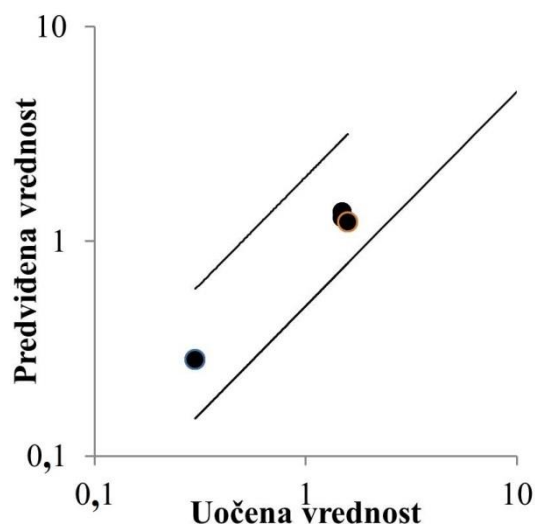
Slika 35. Predviđeni profili koncentracije aciklovira u plazmi zasnovani na profilima brzine rastvaranja aciklovira iz ispitivanih uzoraka u “pojednostavljenim” fiziološki zasnovanim medijumima i *in vivo* profil srednjih koncentracija aciklovira u plazmi nakon oralne primene leka u preprandijalnim uslovima (507). Profili A1 i A2 *FaSSIFb*, *FaSSIFs* sa 0,05% NaLS i polisorbata 80 se međusobno preklapaju, kao i profili A1 i A2 *FeSSIFb*, *FeSSIFs* sa 0,1% polisorbata 80

Predviđene vrednosti farmakokinetičkih parametara za preprandijalno stanje izračunate primenom razvijenog PBPK modela se nalaze u opsegu dvostrukog odstupanja od srednje vrednosti *in vivo* dobijenih parametara (Tabela 20 i Slika 36). Dobijeni rezultati ukazuju da bi medijumi *FaSSIFb*, *FaSSIFs* sa 0,05% NaLS i *FaSSIFs* sa 0,05% polisorbata 80 mogli da se koriste kao biorelevantni za ispitivanje brzine rastvaranja aciklovira iz konvencionalnih tableta u preprandijalnim uslovima.

Tabela 20. Prikaz vrednosti farmakokinetičkih parametara predviđenih na osnovu profila brzine rastvaranja aciklovira iz ispitivanih uzoraka tableta u “pojednostavljenim” fiziološki zasnovanim medijuma koji simuliraju preprandijalne uslove i vrednosti uočene pri preprandijalnim uslovima *in vivo*

Medijum	Parametar	Preparat	predviđena vrednost ( <i>in silico</i> )	srednja <i>in vivo</i> vrednost (opseg individualnih vrednosti)	greška predviđanja
<i>FaSSIFb</i>	$C_{max}$ (µg/ml)	A1	0,28	0,30 (0,19-0,9) <sup>a</sup>	0,93
		A2			
<i>FaSSIFs</i> sa 0,05% NaLS		A1			
		A2			
<i>FaSSIFs</i> sa 0,05% polisorbata 80		A1			
		A2			
<i>FaSSIFb</i>	$t_{max}$ (h)	A1	1,28	1,5 <sup>a</sup>	0,85
		A2	1,36		0,91
<i>FaSSIFs</i> sa 0,05% NaLS		A1	1,28		0,85
		A2	1,36		0,91
<i>FaSSIFs</i> sa 0,05% polisorbata 80		A1	1,36		0,91
		A2	1,28		0,85
<i>FaSSIFb</i>	$PIK_{0-\infty}$ (µg h/ml)	A1	1,23	1,58 (0,8-2,9) <sup>a</sup>	0,78
		A2			
<i>FaSSIFs</i> sa 0,05% NaLS		A1			
		A2			
<i>FaSSIFs</i> sa 0,05% polisorbata 80		A1			
		A2			
<i>FaSSIFb</i>	F %	A1	10,24	10-20 <sup>b</sup>	/
		A2			
<i>FaSSIFs</i> sa 0,05% NaLS		A1			
		A2			
<i>FaSSIFs</i> sa 0,05% polisorbata 80		A1			
		A2			

<sup>a</sup>vrednost se odnosi na *in vivo* profil srednjih koncentracija aciklovira u preprandijalnim uslovima preuzet iz ref. (507); <sup>b</sup>Vrednost preuzeta iz ref. (501)



Slika 36. Poređenje vrednosti farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $PIK_{0-\infty}$  i  $t_{max}$ ) predviđenih na osnovu profila brzine rastvaranja aciklovira iz ispitivanih uzoraka tableta u “pojednostavljenim” fiziološki zasnovanim medijumima i *in vivo* uočenih vrednosti ovih parametara nakon oralne primene aciklovira u uslovima na gladno (Studija C)

Farmakokinetički profili predviđeni na osnovu profila brzine rastvaranja aciklovira u medijumima koji simuliraju uslove primene leka nakon obroka su takođe bili međusobno slični i gotovo podudarni (Slika 35 i Tabela 21). U poređenju sa profilima u preprandijalnom stanju, uočava se nešto niža vrednost  $C_{max}$  i nešto veća vrednost  $t_{max}$  usled produženog vremena zadržavanja leka u želucu u postprandijalnom stanju. Međutim, ove razlike nisu dovele do značajne promene u predviđenom obimu apsorpcije, izraženom preko  $PIK_{0-\infty}$  vrednosti (Tabela 22). Kada je simulacija vršena na osnovu profila brzine rastvaranja aciklovira u pojednostavljenim “biorelevantnim” medijumima sa NaLS predviđene su iste  $PIK_{0-\infty}$  vrednosti za preprandijalno i postprandijalno stanje. U skladu sa navedenim, rezultati PBPK modelovanja ukazuju da uticaj hrane na apsorpciju aciklovira nije značajan. U literaturi nisu dostupni podaci o uticaju hrane na apsorpciju aciklovira iz tableta u dozi 200 mg, te za ovu dozu nije moguće izvršiti direktno poređenje između predviđenih i *in vivo* uočenih profila. Međutim, u *in vivo* studiji (510) koja je sprovedena za tablete aciklovira u dozi od 800 mg takođe je pokazano da prisustvo hrane dovodi do smanjene vrednosti  $C_{max}$  i povećanja vrednosti  $t_{max}$ , ali ne i do značajne promene vrednosti  $PIK_{0-\infty}$  (Tabela 22). U *biowaiver* monografiji aciklovira se navodi da prisustvo hrane ne utiče značajno na brzinu i stepen apsorpcije aciklovira (504). Uzevši u obzir ove podatke može se konstatovati da je na osnovu izabranih *in vitro* uslova ispitivanja brzine rastvaranja aciklovira iz tableta u medijumima *FeSSIFb*, *FeSSIFs* sa 0,1% NaLS i *FeSSIFs* sa 0,1% polisorbata 80 postignuto dobro predviđanje, odnosno odsustvo uticaja hrane na apsorpciju aciklovira.

Tabela 21. Prikaz vrednosti farmakokinetičkih parametara predviđenih na osnovu profila brzine rastvaranja aciklovira iz ispitivanih uzoraka tableta u “pojednostavljenim” fiziološki zasnovanim medijumima koji simuliraju uslove u postprandijalnom stanju

Medijum	Parametar	Preparat	predviđena vrednost (in silico)	
<i>FeSSIFb</i>	$C_{max}$ (µg/ml)	A1	0,21	
		A2		
<i>FeSSIFs</i> sa 0,1% NaLS		A1	0,22	
		A2		
<i>FeSSIFs</i> sa 0,1% polisorbata 80		A1	0,21	
		A2		
<i>FeSSIFb</i>		$t_{max}$ (h)	A1	2,24
			A2	2,19
<i>FeSSIFs</i> sa 0,1% NaLS	A1		2,32	
	A2		2,19	
<i>FeSSIFs</i> sa 0,1% polisorbata 80	A1		2,24	
	A2		2,19	
<i>FeSSIFb</i>	$PIK_{0-\infty}$ (µg h/ml)	A1	1,16	
		A2	1,18	
<i>FeSSIFs</i> sa 0,1% NaLS		A1	1,23	
		A2	1,23	
<i>FeSSIFs</i> sa 0,1% polisorbata 80		A1	1,18	
		A2	1,17	
<i>FeSSIFb</i>		F %	A1	9,86
			A2	9,68
<i>FeSSIFs</i> sa 0,1% NaLS	A1		10,24	
	A2			
<i>FeSSIFs</i> sa 0,1% polisorbata 80	A1		9,78	
	A2		9,84	

Tabela 22. Uticaj hrane na apsorpciju aciklovira – odnos vrednosti osnovnih farmakokinetičkih parametara u uslovima primene nakon obroka i primene na gladno

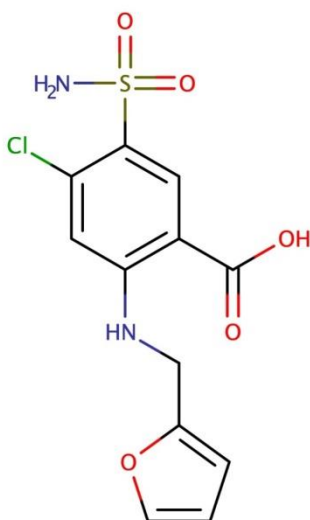
Uslovi ispitivanja	Odnos vrednosti parametra postprandijalno/preprandijalno		
	$C_{max}$	$t_{max}$	$PIK_{0-\infty}$
<i>In vivo</i> (Studija F)	0,99	1,5	0,96
<i>FeSSIFb</i> / <i>FaSSIFb</i>	0,75 (A1 i A2)	1,81 (A1) 1,65 (A2)	0,94 (A1) 0,96 (A2)
<i>FeSSIFs</i> / <i>FaSSIFs</i> sa dodatkom NaLS	0,75 (A1 i A2)	1,75 (A1) 1,71 (A2)	1 (A1 i A2)
<i>FeSSIFs</i> / <i>FaSSIFs</i> sa dodatkom polisorbata 80	0,75 (A1 i A2)	1,71 (A1 i A2)	0,97 (A1) 0,95 (A2)

Kao što je već navedeno biofarmaceutska klasifikacija aciklovira zavisi od doze i prema rezultatima *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja aciklovira iz tableta jačine 200 mg oba ispitivana preparata su ispunila uslove za veoma brzo rastvaranje u svim ispitivanim medijumima. Takođe, prema predviđanjima razvijenog PBPK modela hrana ne utiče značajno na apsorpciju aciklovira, dok je primenom RF modela aciklovir klasifikovan u klasu FE↓ („negativan“ uticaj hrane) zbog njegove niske permeabilnosti i obima metabolizma i visokog odnosa D/S, jer je u obzir uzeta doza od 800mg. Wu i Benet (163) su postavili hipotezu da bi jedan od razloga za izostajanje efekta hrane na

apsorpciju aciklovira mogao da bude uticaj obroka na efluks i influks transportere koji su potencijalno uključeni u njegovu apsorpciju.

#### 5.4.2. Furosemid

Furosemid je derivat antranilne kiseline (Slika 37) i jak diuretik sa brzim početkom dejstva. Koristi se u tretmanu edema povezanih sa zatajivanjem srca (uključujući plućni edem) i poremećajima funkcije bubrega i jetre. Koristi se i kod oligurije uzrokovane insuficijencijom bubrega, kao i u tretmanu hipertenzije sam ili u kombinaciji sa drugim antihipertenzivnim lekovima. Uobičajna doza u terapiji edema je 40 mg jednom dnevno, dok se u terapiji hipertenzije primenjuje u dozi od 40 do 80 mg dnevno (318).



4-hloro-2-(furan-2-il-metilamino)-5-sulfamoilbenzojeva kiselina

Slika 37. Strukturna formula i hemijski naziv furosemida

##### *Fizičko-hemijske i biofarmaceutske karakteristike*

Furosemid je slaba kiselina, čija je pKa vrednost 3,8 (karboksilna kiselina) (516), i pokazuje pH-zavisnu rastvorljivost u fiziološkom opsegu pH vrednosti; 0,04 (pH 1,2), 0,16 (pH 4,6) i 3,61 (pH 6,8) (84). Particioni koeficijent (logP) furosemida je 2,56 (517), dok je na pH 7,4 izmeren distribicioni koeficijent ( $\log D_{pH7,4}$ ) od -0,69 (273) što ukazuje na hidrofilnu prirodu ove lekovite supstance. Permeabilnost furosemida je regionalno-zavisna i eksperimentalno određena jejunalna permeabilnosti kod čoveka je približno  $0,48 \times 10^{-4}$  cm/s (84, 518). U biofarmaceutskom smislu furosemid je okarakterisan kao nisko permeabilna/nisko rastvorljiva lekovita supstanca (273), koja pokazuje visok stepen inter- i intra-individualne varijabilnosti u pogledu apsorpcije (519).

Prema rezultatima klasterovanja i klasifikacije sprovedene u okviru ovog istraživanja (poglavlje 5.2.2.) grupisan je sa nisko permeabilnim lekovitim supstancama ( $P_{eff} < 1 \times 10^{-4}$  cm/s). Apsorpcija furosemida iz GIT-a je brza, ali varijabilna i nepotpuna (318). U literaturi se navode različiti podaci za bioraspoloživost ove lekovite supstance; 60-70% (318), 51% (519) i 37-51% (520). U skladu sa navedenim rezultatima, furosemid je u okviru regulatorne smernice ICH M9 naveden kao primer lekovite supstance sa ograničenom permeabilnošću (18).

U literaturi se navodi da prisustvo hrane dovodi do smanjenja obima apsorpcije furosemida nakon oralne primene (519). Primenom RF modela za predviđanje uticaja hrane na intestinalnu

apSORpciju lekova razvijenog u okviru ovog istraživanja furosemid je klasifikovan u klasu F↓ („negativan“ uticaj hrane).

*In vivo podaci*

U Tabeli 23 prikazani su rezultati farmakokinetičkih *in vivo* studija nakon intravenske i oralne primene preparata furosemida.

Tabela 23. Furosemid – rezultati *in vivo* studija

Oznaka studije	Farmaceutski oblik leka	Doza (mg)	PIK <sub>0-∞</sub> (µg h/ml)	C <sub>max</sub> (µg/ml)	t <sub>max</sub> (h)	Broj ispitanika	Ref.
A	bolus injekcija	40	7,49	8,04	/	8	(519)
	tableta	40	2,45	0,75	1,13	8	
	tableta (nakon obroka)	40	1,46	0,43	2,38	8	
B	bolus injekcija	40	7,49	8,04	0,09	16	(521)
C	tableta	40	2,13	0,61	1,5	10	(522)
	tableta (nakon obroka)	40	1,10	0,35	1	10	
D	bolus injekcija	80	9,20	15	0,152	4	(520)
	tableta	80	4,90	2,16	1,17	8	
	tableta (nakon obroka)	80	3,5	1,07	3,51	8	

Raspoloživi rezultati *in vivo* studija ukazuju na uticaj hrane na apSORpciju istovremeno primenjenog furosemida, uz značajno smanjenje obima i brzine apSORpcije leka na koje ukazuju smanjene vrednosti PIK i produženo vreme do postizanja maksimalne koncentracije leka u krvi (sa 1,13, odnosno 1,17 h na 2,38, odnosno 3,51 h), osim u studiji C u kojoj je uočeno smanjeno vreme postizanja maksimalne koncentracije leka u krvi kada su tablete furosemida primenjene nakon obroka (522).

*In vitro ispitivanje brzine rastvaranja*

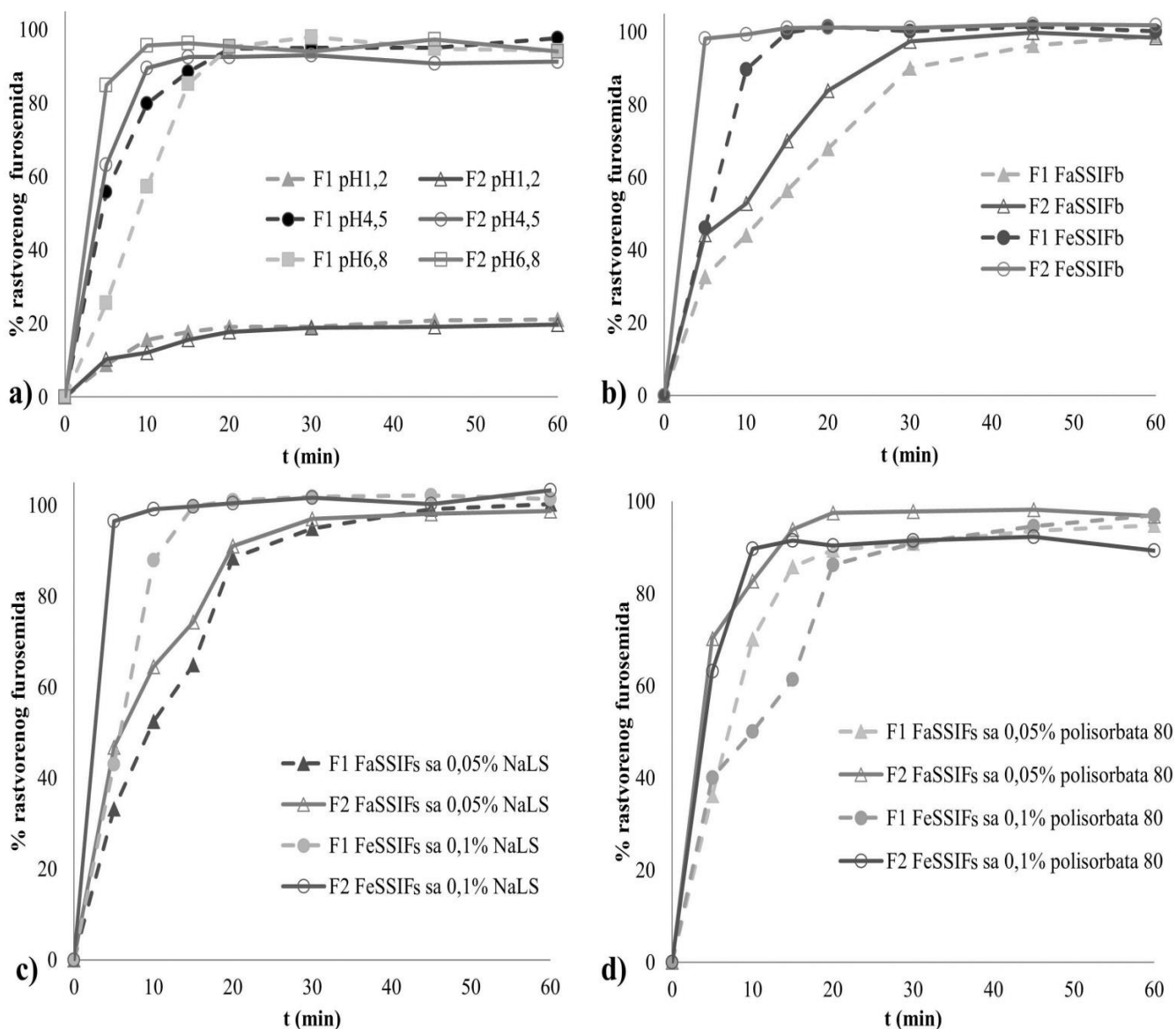
*In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja furosemida sprovedeno je za dva uzorka komercijalno dostupnih tableta sa dozvolom za lek u Bosni i Hercegovini koje sadrže 40 mg furosemida. Sastav ispitivanih preparata prikazan je u Tabeli 24.

Tabela 24. Sastav ispitivanih tableta furosemida

Uzorak F1	Uzorak F2
laktoza monohidrat magnezijum-stearat kukuruzni skrob povidon talk	laktoza monohidrat magnezijum-stearat kukuruzni skrob povidon talk natrijum-karboksimetilskrob (tip A) bezvodni koloidni silicijum-dioksid

Ispitivani uzorci tableta furosemida F1 i F2 sličnog su kvalitativnog sastava i sadrže konvencionalne ekscipijense koji ukazuju da je primenjena metoda izrade tableta vlažna granulacija. Za razliku od uzorka F1, uzorak F2 u svom sastavu sadrži i natrijum-karboksimetilskrob (tip A) kao sredstvo za raspadanje i bezvodni koloidni silicijum-dioksid kao sredstvo za klizanje.

Na Slici 38 su prikazani eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja furosemida iz tableta sa trenutnim oslobađanjem u različitim medijumima. Rastvaranje furosemida iz oba ispitivana preparata u medijumu pH 1,2 je bilo sporo i nepotpuno (22% nakon 60 min za F1 i 19% nakon 60 min za F2), dok je u acetatnom puferu pH 4,5 i fosfatnom puferu pH 6,8 rastvaranje bilo veoma brzo (> 85% supstance rastvoreno je nakon 15 minuta). Porast obima rastvaranja furosemida iz tableta sa porastom pH vrednosti medijuma je posledica njegove veće rastvorljivosti, pri višim pH vrednostima (88). U medijumu *FaSSIFb* je do potpunog rastvaranja furosemida iz oba ispitivana preparata došlo nakon 30 minuta. Prisustvo polisorbata 80 je dovelo do bržeg rastvaranja lekovite supstance iz oba ispitivana preparata u odnosu na *FaSSIFb* ( $f_2 < 50$ ), dok je u *FaSSIFs* sa 0,05% NaLS do potpunog rastvaranja lekovite supstance takođe došlo nakon 30 min. U *FeSSIFb* i *FeSSIFs* sa 0,1% NaLS, je u toku prvih 15 minuta došlo do potpunog rastvaranja furosemida iz oba ispitivana preparata. U *FeSSIFs* sa 0,1% polisorbata 80 je iz uzorka F1 više od 85% furosemida rastvoreno za 20 minuta, dok se rastvaranje lekovite supstance iz uzorka tableta F2 može opisati kao veoma brzo. Nešto brže rastvaranje furosemida iz uzorka tableta F2 u skladu je sa činjenicom da ovaj preparat sadrži natrijum-karboksimetilskrob kao sredstvo za raspadanje koje doprinosi bržoj dezintegraciji tableta i olakšava rastvaranje aktivne supstance.



Slika 38. Profili brzine rastvaranja furosemida iz tableta u različitim medijumima: a) medijumi pH 1,2; pH 4,5; pH 6,8; b) *FaSSIFb* i *FeSSIFb*; c) "pojednostavljeni" fiziološki zasnovani medijumi sa NaLS; d) "pojednostavljeni" fiziološki zasnovani medijumi sa polisorbatom 80



### Razvoj i validacija PBPK modela

Za razvoj modela za predviđanje *in vivo* ponašanja furosemida nakon intravenske primene i oralne primene na gladno, odnosno nakon uzimanja obroka su korišteni ulazni parametri prikazani u Tabeli 25.

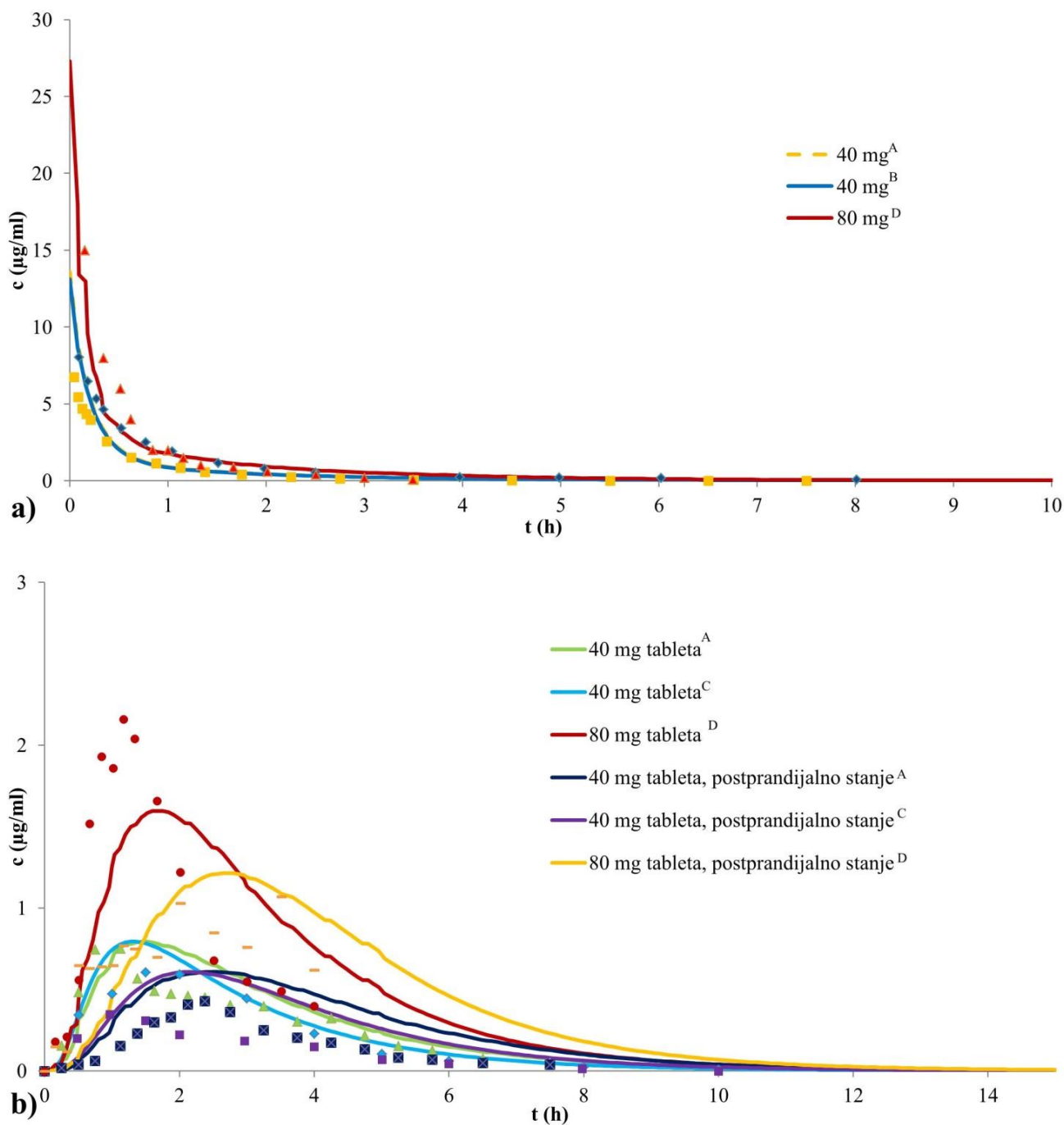
Prilikom razvoja modela uzeta je u obzir pH-zavisna rastvorljivost furosemida u fiziološkom opsegu pH vrednosti, a *in silico* je simuliran i efekat žučnih soli na rastvorljivost i difuzioni koeficijent furosemida (integrisana GastroPlus™ softverska opcija). Za razvoj modela su korištene regionalne vrednosti permeabilnosti, jer furosemid pokazuje regionalno-zavisnu permeabilnost (84). Farmakokinetika furosemida je opisana dvoprostornim modelom (523).

Tabela 25. Ulazni parametri korišteni za razvoj PBPK modela furosemida

Parametar	Vrednost
Molekulska masa (g/mol)	330,75
logD	-0,69 (pH 7,4) <sup>a</sup>
pKa	-0,59; 3,88; 9,37 <sup>b</sup>
$P_{\text{eff}} (\times 10^{-4} \text{ cm/s})$ , transcelularna permeabilnost	Želudac: 0 Duodenum: 0,480 Jejunum 1 : 0,480 Jejunum 2: 0,480 Ileum 1: 0,176 Ileum 2: 0,176 Ileum 3: 0,176 Cekum: 0,050 Asc kolon: 0,050 <sup>b</sup>
Oralne doze (mg)	40, 80
Intravenske doze (mg)	40, 80
Referentna rastvorljivost (mg/ml)	3,61 (pH 6,8) <sup>b</sup>
Srednje vreme precipitacije (s)	900 <sup>c</sup>
Koeficijent difuzije ( $\times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ )	0,7289 <sup>d</sup>
Gustina čestica lekovite supstance (g/ml)	1,2 <sup>c</sup>
Efektivni radijus čestica ( $\mu\text{m}$ )	25 <sup>c</sup>
Odnos koncentracije leka u krvi/plazmi	1 <sup>b</sup>
Slobodna frakcija leka u plazmi, $f_u$ (%)	1 <sup>b</sup>
Klirens, CL (l/h/kg)	0,121 <sup>e</sup>
Volumen distribucije, $V_c$ (l/kg)	0,043 <sup>e</sup>
Konstanta distribucije, $k_{1/2}$ (1/h)	0,964 <sup>e</sup>
Konstanta distribucije, $k_{2/1}$ (1/h)	1,614 <sup>e</sup>
Konstanta distribucije, $k_{1/3}$ (1/h)	0,92516 <sup>f</sup>
Konstanta distribucije, $k_{3/1}$ (1/h)	0,70785 <sup>f</sup>
Vreme simulacije (h)	24

<sup>a</sup>Vrednost preuzeta iz ref. (273); <sup>b</sup>Vrednost preuzeta iz ref. (84); <sup>c</sup>GastroPlus™ vrednost; <sup>d</sup>GastroPlus™ procenjena vrednost; <sup>e</sup>Izračunato preko PKPlus™ modula na osnovu *in vivo* profila o koncentraciji leka u plazmi (520); <sup>f</sup>Optimizovana vrednost

Predviđeni profili koncentracije furoseמידa u plazmi nakon intravenske primene i oralne primene na gladno, odnosno nakon uzimanja obroka su prikazani na Slici 39 zajedno sa profilima srednjih koncentracija furoseמידa u plazmi uočenim u okviru *in vivo* studija.



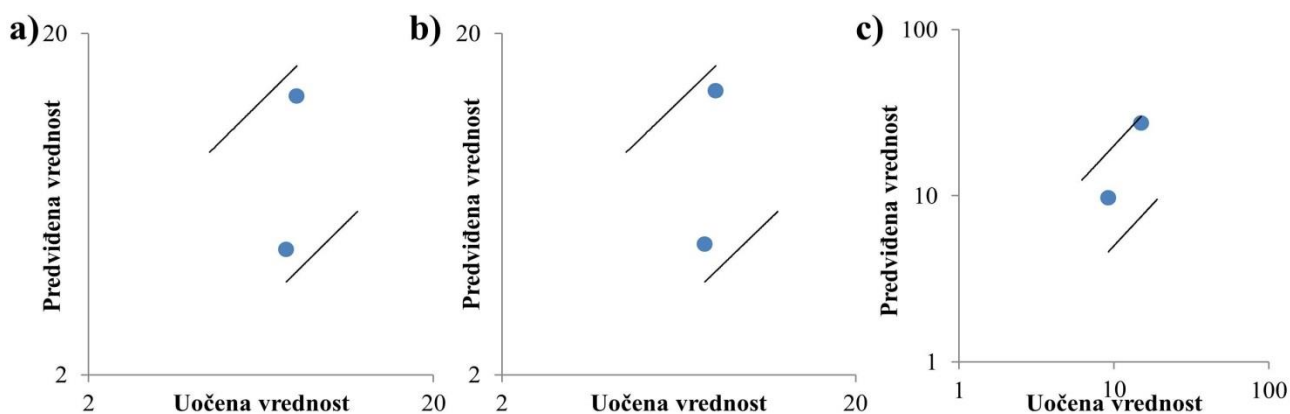
Slika 39. Predviđeni (linije) i *in vivo* (simboli) profili srednjih koncentracija furoseמידa u plazmi nakon primene: a) bolus injekcije; b) tablete

U cilju validacije modela izvršeno je poređenje predviđenih i *in vivo* uočenih vrednosti farmakokinetičkih parametara. U tabelama 26-28 i na slikama 40-42 prikazane su predviđene i *in vivo* uočene vrednosti farmakokinetičkih parametara nakon intravenske i oralne primene furoseמידa u preprandijalnim i postprandijalnim uslovima. Može se videti da su predviđeni farmakokinetički parametari za intravensku i oralnu primenu u preprandijalnim uslovima bili u opsegu dvostruke

vrednosti *in vivo* dobijenih parametara tj. greška predviđanja je bila od 0,5 do 2. Takođe, dobijena je relativno visoka vrednost koeficijenta korelacije ( $R^2 \geq 0,87$ ) između predviđenih i *in vivo* vrednosti farmakokinetičkih parametara za oralnu primenu leka u preprandijalnim uslovima (Slika 40). Kod oralne primene u postprandijalnim uslovima predviđene vrednosti za  $C_{max}$  i  $t_{max}$  su uglavno bile u opsegu dvostruke vrednosti *in vivo* dobijenih parametara. Međutim, predviđene  $PIK_{0-\infty}$  vrednosti su bile izvan opsega dvostruke vrednosti *in vivo* parametara određenih u dve studije nakon primene tableta sa 40 mg furosemida (519, 522), dok je za tablete sa 80 mg furosemida ova vrednost bila na gornjoj granici opsega dvostruke  $PIK_{0-\infty}$  vrednosti iz *in vivo* studije (520). Koeficijent korelacije između predviđenih i *in vivo* uočenih vrednosti za dozu od 40 mg (522) je bio relativno visok ( $R^2 = 0,87$ ), dok je koeficijenti korelacije između predviđenih i *in vivo* uočenih vrednosti u drugim dvema studijama za doze od 40 i 80 mg bio nizak ( $R^2 \leq 0,39$ ). S obzirom na varijabilnu farmakokinetiku furosemida (519), teško je proceniti prihvatljivost predloženog odstupanja od srednje vrednosti *in vivo* parametara kao kriterijuma za procenu razvijenog PBPK modela (524).

Tabela 26. Poređenje predviđenih i *in vivo* uočenih vrednosti farmakokinetičkih parametara nakon intravenske primene furosemida

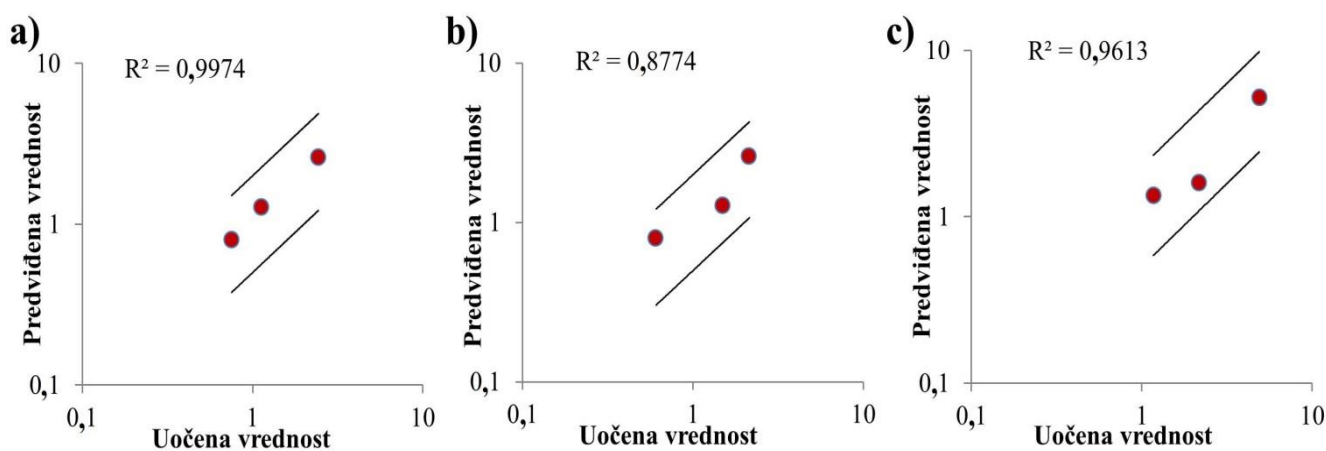
	parametar	stvarna vrednost ( <i>in vivo</i> )	predviđena vrednost ( <i>in silico</i> )	greška predviđanja
Studija A 40 mg bolus injekcija	$C_{max}$ (µg/ml)	8,04 <sup>a</sup>	13,10	1,63
	$PIK_{0-\infty}$ (µg h/ml)	7,49 <sup>a</sup>	4,66	0,62
Studija B 40 mg bolus injekcija	$C_{max}$ (µg/ml)	8,04 <sup>b</sup>	13,58	1,69
	$PIK_{0-\infty}$ (µg h/ml)	7,49 <sup>b</sup>	4,83	0,64
Studija D 80 mg bolus injekcija	$C_{max}$ (µg/ml)	15 <sup>c</sup>	27,28	1,82
	$PIK_{0-\infty}$ (µg h/ml)	9,20 <sup>c</sup>	9,69	1,05



Slika 40. Poređenje predviđenih i *in vivo* uočenih farmakokinetičkih parametara ( $PIK_{0-\infty}$  i  $C_{max}$ ) nakon primene bolus injekcije furosemida: a) 40 mg (Studija A); b) 40 mg (Studija B); c) 80 mg (Studija D)

Tabela 27. Poređenje predviđenih i *in vivo* uočenih vrednosti farmakokinetičkih parametara nakon oralne primene furosemida pri preprandijalnim uslovima

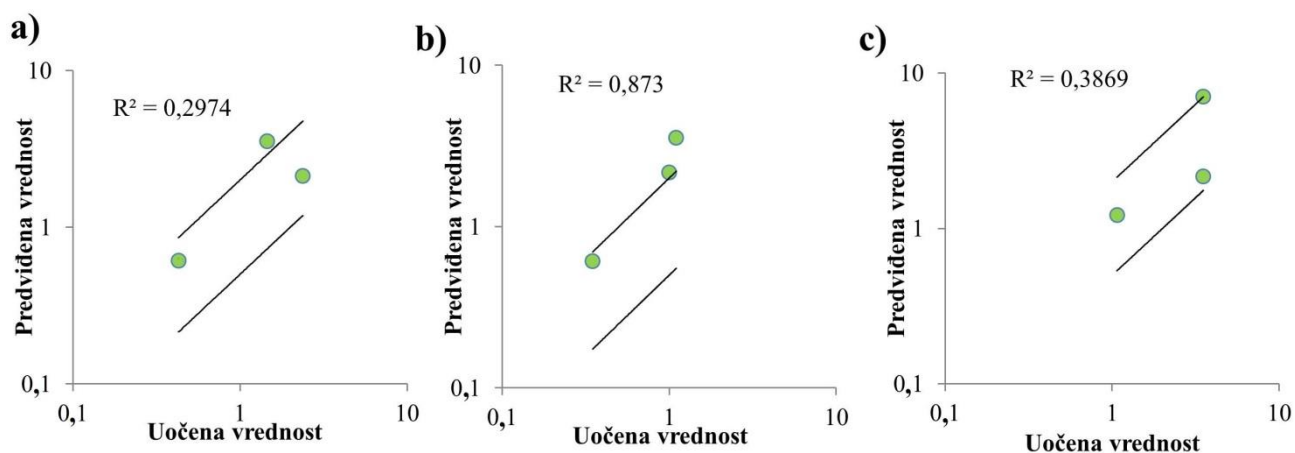
	parametar	stvarna vrednost ( <i>in vivo</i> )	predviđena vrednost ( <i>in silico</i> )	greška predviđanja
Studija A 40 mg tableta	$C_{max}$ (µg/ml)	0,75	0,80	1,06
	$t_{max}$ (h)	1,13	1,28	1,14
	$PIK_{0-\infty}$ (µg h/ml)	2,44	2,59	1,06
	Fa %	/	54,84	/
	F %	/	53,78	/
Studija C 40 mg tableta	$C_{max}$ (µg/ml)	0,61	0,80	1,31
	$t_{max}$ (h)	1,50	1,28	0,85
	$PIK_{0-\infty}$ (µg h/ml)	2,13	2,59	1,22
	Fa %	/	54,84	/
	F %	/	53,78	/
Studija D 80 mg tableta	$C_{max}$ (µg/ml)	2,16	1,60	0,74
	$t_{max}$ (h)	1,17	1,34	1,14
	$PIK_{0-\infty}$ (µg h/ml)	4,90	5,20	1,06
	Fa %	/	54,73	/
	F %	/	53,67	/



Slika 41. Poređenje predviđenih i *in vivo* uočenih vrednosti farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-\infty}$ ) nakon oralne primene preparata furosemida u uslovima na gladno: a) 40 mg tableta (Studija A); b) 40 mg tableta (Studija C); c) 80 mg tableta (Studija D)

Tabela 28. Poređenje predviđenih i *in vivo* uočenih vrednosti farmakokinetičkih parametara nakon oralne primene furosemida pri postprandijalnim uslovima

	parametar	stvarna vrednost ( <i>in vivo</i> )	predviđena vrednost ( <i>in silico</i> )	greška predviđanja
Studija A 40 mg tableta	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	0,43	0,61	1,42
	$t_{max}$ (h)	2,38	2,13	0,89
	$PIK_{0-\infty}$ ( $\mu\text{g h/ml}$ )	1,46	3,54	2,43
	Fa %	/	54,32	/
	F %	/	53,25	/
Studija C 40 mg tableta	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	0,35	0,61	1,75
	$t_{max}$ (h)	1	2,16	2,16
	$PIK_{0-\infty}$ ( $\mu\text{g h/ml}$ )	1,10	3,54	3,21
	Fa %	/	54,32	/
	F %	/	53,25	/
Studija D 80 mg tableta	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	1,07	1,22	1,14
	$t_{max}$ (h)	3,51	2,16	0,61
	$PIK_{0-\infty}$ ( $\mu\text{g h/ml}$ )	3,50	7,03	2,01
	Fa %	/	54,05	/
	F %	/	52,98	/

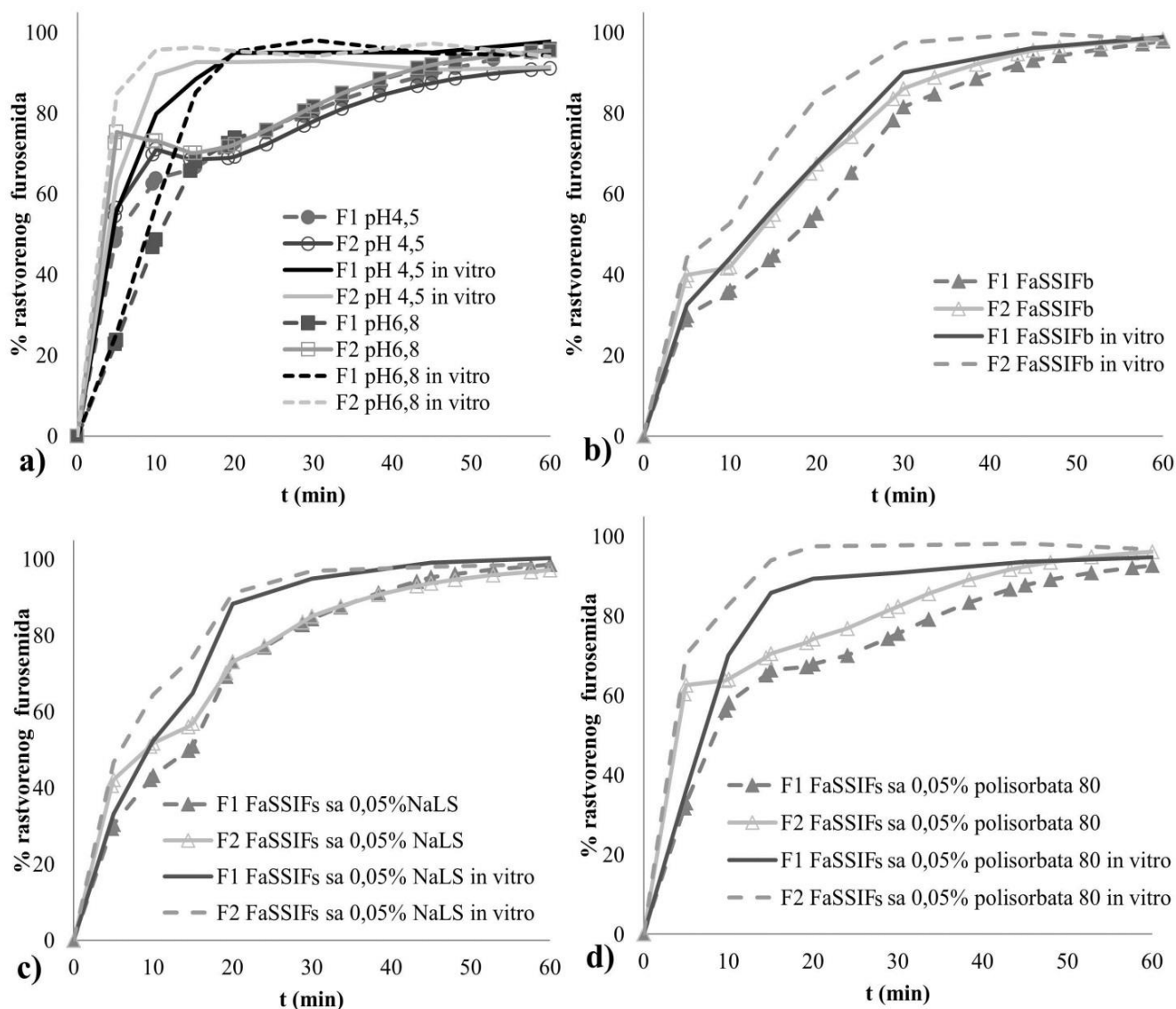


Slika 42. Poređenje predviđenih i *in vivo* uočenih vrednosti farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-\infty}$ ) nakon oralne primene preparata furosemida u postprandijalnim uslovima: a) 40 mg tableta (Studija A); b) 40 mg tableta (Studija C); c) 80 mg tableta (Studija D)

### Primena PBPK modela

Primenom PBPK modela u kombinaciji sa eksperimentalno određenim profilima brzine rastvaranja furosemida iz tableta u različitim medijumima, predviđeni su profili rastvaranja *in vivo* u preprandijalnim i postprandijalnim uslovima (Slika 43). Profili brzine rastvaranja furosemida iz tableta u medijumima pH 1,2, *FeSSIFb* i *FeSSIFs* sa 0,1% NaLS ili polisorbata 80, koji su predviđeni pomoću PBPK modela su bili slični *in vitro* uočenim profilima. Sa druge strane, kao što se može videti na Slici 43, primenom PBPK modela je predviđeno značajno sporije rastvaranje furosemida iz tableta u medijumima pH 4,5, pH 6,8, *FaSSIFb* i *FaSSIFs* sa 0,05% NaLS ili

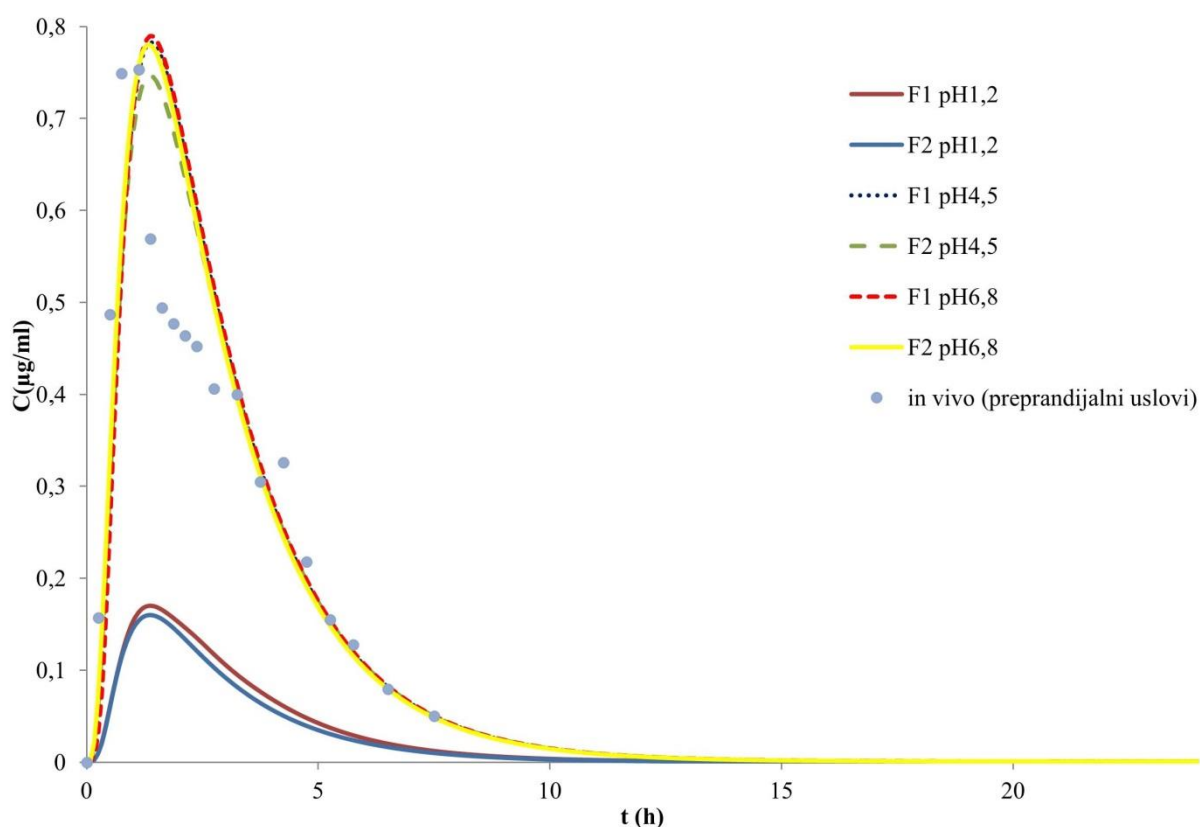
polisorbata 80, u odnosu na *in vitro* dobijene rezultate. Ovo je očekivano s obzirom na to da je furosemid slaba kiselina čija je pKa vrednost 3,8. Van Den Abeele (525) i saradnici su pokazali da kod nisko rastvorljivih, slabo kiselih lekovitih supstanci dolazi do precipitacije u želucu i brzog ponovnog rastvaranja po prelasku leka u tanko crevo. Dakle, sporije rastvaranje furosemida iz tableta u medijumima pH 4,5, pH 6,8, *FaSSIFb* i *FaSSIFs* sa 0,05% NaLS ili polisorbata 80, koje je predviđeno pomoću PBPK modela, se može pripisati očekivanoj precipitaciji furosemida u okruženju sa pH vrednošću manjom od 3,8. Van Den Abeele (525) i saradnici su takođe uočili da u postprandijalnim uslovima ne dolazi do precipitacije kisele lekovite supstance u želucu, jer se u prisustvu hrane povećava pH vrednost želuca. *In silico* predviđeni profili rastvaranja furosemida *in vivo* u postprandijalnim uslovima su, kao što je već rečeno, bili identični odgovarajućim profilima uočenim *in vitro*. Dakle, PBPK modeli se mogu koristiti za mehanističko ispitivanje i procenu uticaja hrane na brzinu rastvaranja furosemida iz tableta.



Slika 43. Profili brzine rastvaranja furosemida iz tableta u različitim medijumima uočeni *in vitro* i predviđeni pomoću PBPK modela: a) medijumi pH 4,5; pH 6,8; b) *FaSSIFb*; c) “pojednostavljeni“ fiziološki zasnovani medijumi sa NaLS; d) “pojednostavljeni“ fiziološki zasnovani medijumi sa polisorbatom 80

*In silico* predviđeni profili koncentracije furosemida u plazmi, koji su zasnovani na profilima brzine rastvaranja furosemida iz analiziranih komercijalno dostupnih tableta u medijumima različitih pH vrednosti (1,2, 4,5 i 6,8), kao i *in vivo* uočen profil srednjih koncentracija furosemida u plazmi

nakon primene tableta od 40 mg u preprandijalnim uslovima (Studija A) su prikazani na Slici 44. Kao što se može uočiti, profili koji su zasnovani na profilima brzine rastvaranja furosemida iz tableta u medijumu pH 1,2 se razlikuju od ostalih profila tj. predviđene  $C_{max}$  i  $PIK_{0-\infty}$  vrednosti su više od četiri puta manje od *in vivo* uočenih vrednosti, dok je jedino predviđena vrednost  $t_{max}$  bila u opsegu dvostrukog odstupanja od srednje vrednosti *in vivo* dobijenih parametara (Tabela 29 i Slika 45). Sa druge strane, predviđeni farmakokinetički profili koji su zasnovani na profilima brzine rastvaranja furosemida iz tableta u medijumima pH 4,5 i 6,8 su međusobno slični i svi predviđeni farmakokinetički parametri ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-\infty}$ ) su u opsegu dvostrukog odstupanja od srednje vrednosti *in vivo* dobijenih parametara (Tabela 29 i Slika 45) što ukazuje da su *in vitro* rezultati ispitivanja brzine rastvaranja furosemida iz tableta u medijumima pH 4,5 i pH 6,8 dobar pokazatelj *in vivo* ponašanja furosemida u organizmu nakon oralne primene u preprandijalnim uslovima. Ovakvi rezultati simulacija su u skladu sa eksperimentalno dobijenim rezultatima koji pokazuju da je rastvaranje furosemida iz oba ispitivana preparata u medijumu pH 1,2 bilo nepotpuno (nakon 60 min rastvoreno je 22%, odnosno 19% furosemida iz uzoraka tableta F1 i F2, redom), dok je u medijumima pH 4,5 i pH 6,8 rastvaranje bilo veoma brzo (> 85% supstance nakon 15 minuta). Dobijeni rezultati ukazuju da bi medijumi pH 4,5 i pH 6,8 mogli da se koriste kao biorelevantni za ispitivanje brzine rastvaranja furosemida iz konvencionalnih tableta u preprandijalnim uslovima.

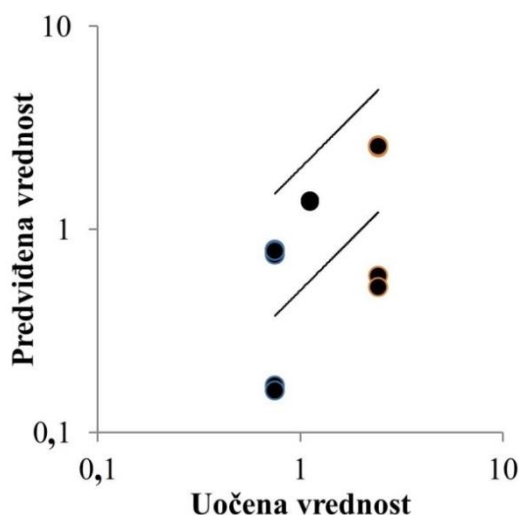


Slika 44. Predviđeni profili koncentracije furosemida u plazmi zasnovani na profilima brzine rastvaranja furosemida iz komercijalno dostupnih tableta jačine 40 mg u medijumima različitih pH vrednosti i *in vivo* profil srednjih koncentracija furosemida u plazmi nakon oralne primene u preprandijalnim uslovima (519). Profili F1 pH 4,5 i F1 i F2 pH 6,8 se međusobno preklapaju

Tabela 29. Prikaz vrednosti farmakokinetičkih parametara predviđenih na osnovu profila brzine rastvaranja furoseמידa iz ispitivanih uzoraka tableta u medijumima različitim pH vrednosti i vrednosti uočenih *in vivo* u preprandijalnim uslovima

Medijum	Parametar	Preparat	predviđena vrednost ( <i>in silico</i> )	stvarna vrednost ( <i>in vivo</i> ) <sup>a</sup>	greška predviđanja		
pH 1,2	$C_{max}$ (μg/ml)	F1	0,17	0,75 (0,52 - 1,70)	0,23		
		F2	0,16		0,21		
pH 4,5		F1	0,78		1,04		
		F2	0,75		1		
pH 6,8		F1	0,79		1,05		
		F2	0,78		1,04		
pH 1,2	$t_{max}$ (h)	F1	1,38	1,125 (0,50 - 2,38)	1,23		
pH 4,5		F2					
		F1					
pH 6,8		F2	1,36		1,21		
		pH 1,2	$PIK_{0-\infty}$ (μg h/ml)		F1	0,59	2,43 (1,24-2,80)
F2					0,52	0,21	
pH 4,5	F1	2,58		1,06			
	F2	2,52		1,04			
pH 6,8	F1	2,58		1,06			
	F2	2,56		1,05			
pH 1,2	F %	F1	12,20	27,20 - 80,50	/		
pH 4,5		F2	10,83				
		F1	53,43				
pH 6,8		F2	52,34				
		F1	53,54				
		F2	53,03				

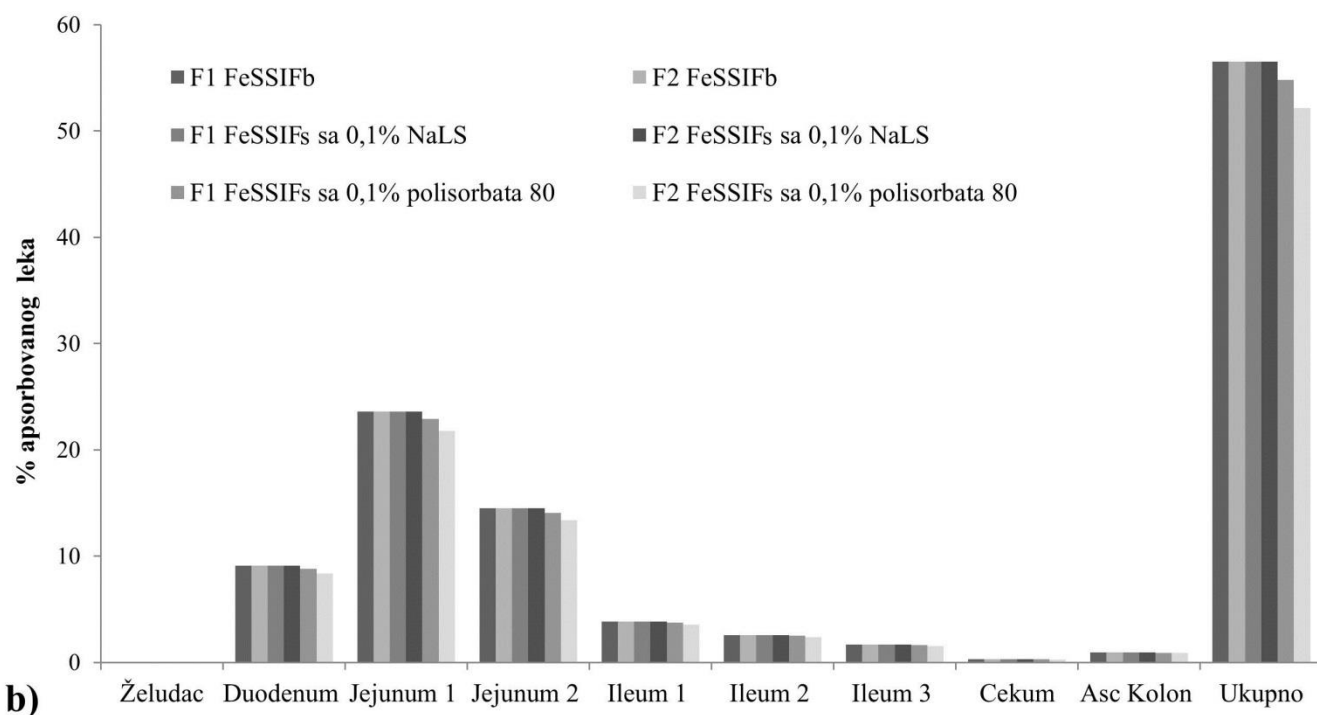
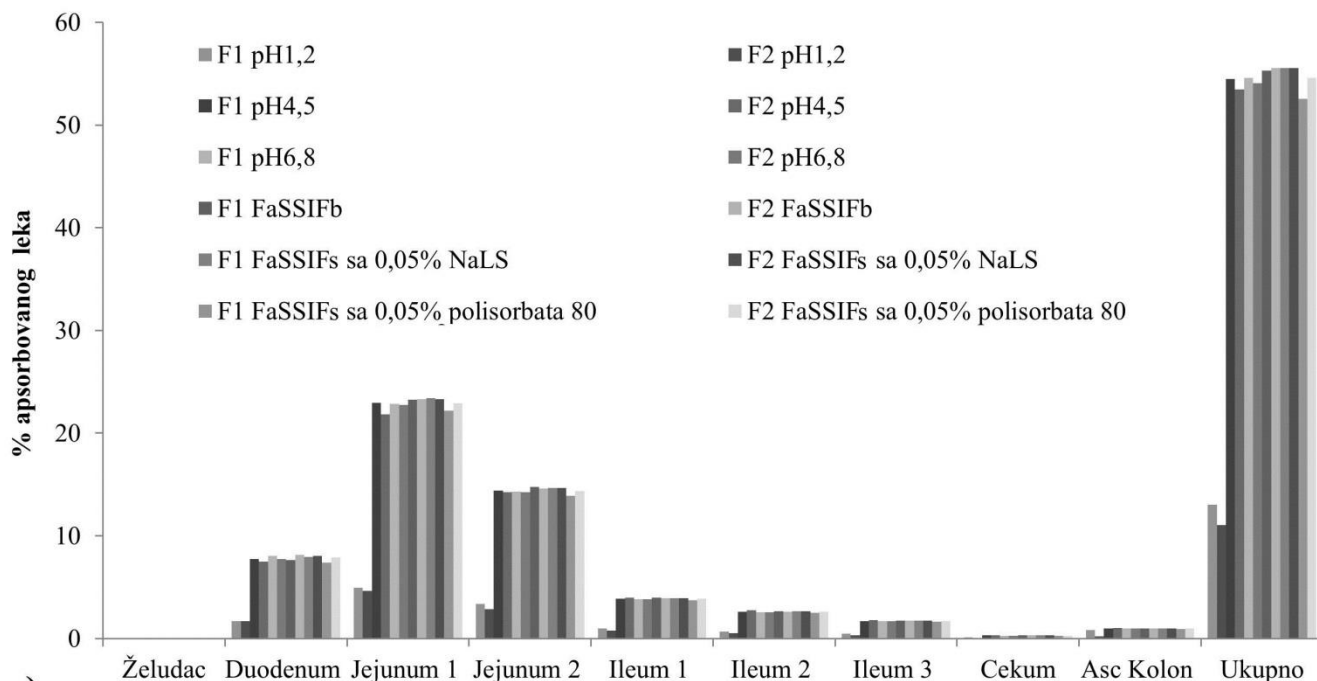
<sup>a</sup>vrednost se odnosi na *in vivo* profil srednjih koncentracijaj furoseמידa u preprandijalnim uslovima preuzet iz ref. (519), u zagradi je dat opseg individualnih vrednosti za  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-\infty}$



Slika 45. Poređenje vrednosti farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-\infty}$ ) predviđenih na osnovu profila brzine rastvaranja furoseמידa iz ispitivanih uzoraka tableta u medijumima različitim pH vrednosti i *in vivo* uočenih vrednosti ovih parametara nakon oralne primene furoseמידa u uslovima na gladno (Studija A)

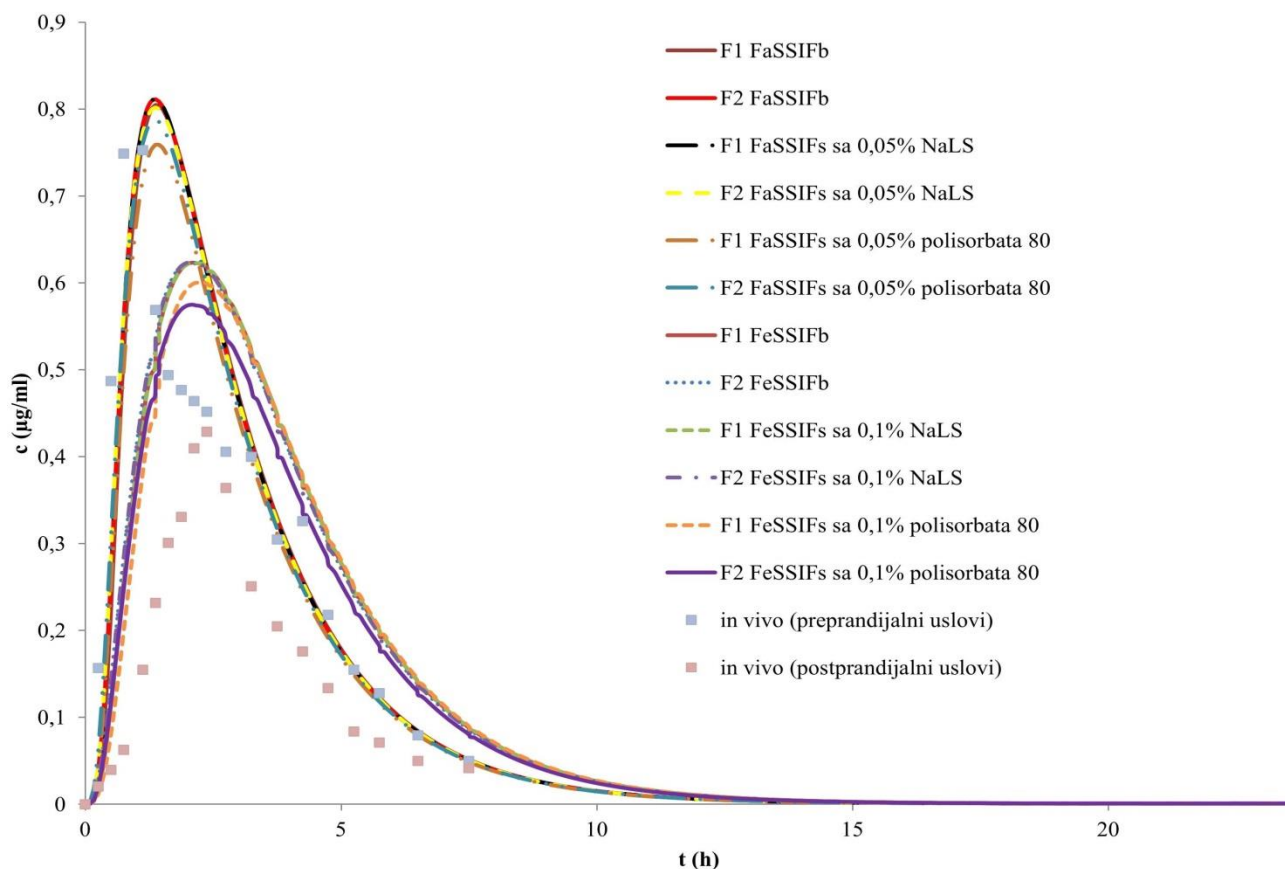


Predviđene vrednosti za bioraspoloživost leka kada su kao ulazni parametri za simulaciju korišćeni profili brzine rastvaranja furosemida u medijumima pH 4,5 i 6,8 (Tabela 29) su za oba ispitivana preparata bile u opsegu vrednosti uočenih *in vivo* u okviru Studije A (519). Razvijeni PBPK model apsorpcije je takođe pokazao da se najveći procenat furosemida apsorbuje u proksimalnom delu tankog creva (Slika 46), što je u skladu sa rezultatima drugih *in vitro/in silico* (84, 499) i *in vivo* studija (526).



Slika 46. Procenat apsorbovanog furosemida u različitim regionima GIT-a predviđen na osnovu profila brzine rastvaranja furosemida iz ispitivanih uzoraka tableta u medijumima koji simuliraju uslove primene leka na gladno (a), odnosno nakon obroka (b)

Na Slici 47 su prikazani predviđeni profili koncentracije furosemida u plazmi za preprandijalno i postprandijalno stanje, koji su zasnovani na profilima brzine rastvaranja furosemida u “pojednostavljenim” fiziološki zasnovanim medijumima.



Slika 47. Predviđeni profili koncentracije furosemida u plazmi zasnovani na profilima brzine rastvaranja furosemida iz ispitivanih uzoraka u “pojednostavljenim” fiziološki zasnovanim medijumima i *in vivo* profil srednjih koncentracija furosemida u plazmi nakon oralne primene leka u preprandijalnim i postprandijalnim uslovima (519). (profili F1 *FeSSIFb* i F1 i F2 *FeSSIFs* sa 0,1% NaLS se međusobno preklapaju, kao i profili F1 i F2 *FaSSIFb* i F1 i F2 *FaSSIFs* sa 0,05% NaLS)

Primećuje se da su predviđeni farmakokinetički profili za preprandijalno stanje međusobno slični i sve predviđene vrednosti farmakokinetičkih parametara se nalaze u opsegu dvostrukog odstupanja od srednje vrednosti *in vivo* uočenih parametara (Slika 48 i Tabela 30). To znači da se uslovi *in vitro* ispitivanja koji su korišćeni za određivanje profila brzine rastvaranja furosemida iz konvencionalnih tableta u preprandijalnim uslovima mogu smatrati biorelevantnim.

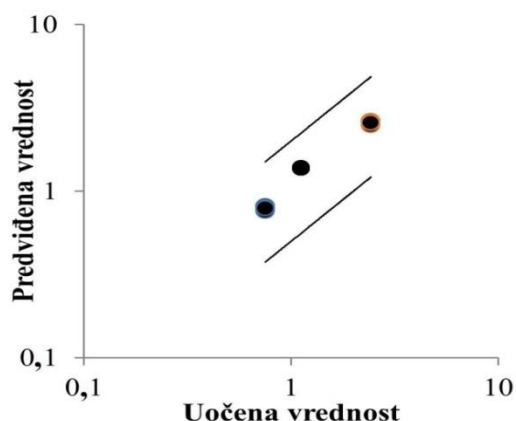
Predviđeni farmakokinetički profili za postprandijalno stanje su takođe međusobno slični, izuzev profila koji su zasnovani na profilima brzine rastvaranja furosemida u medijumu *FeSSIFs* sa 0,1% polisorbata 80. Profili, koji su zasnovani na profilima brzine rastvaranja furosemida u medijumu *FeSSIFs* sa 0,1% polisorbata 80, su pokazali najbolje slaganje sa *in vivo* profilom srednjih koncentracija furosemida u plazmi pri postprandijalnim uslovima. Naime, predviđene  $C_{max}$  i  $t_{max}$  vrednosti za sve profile su bile u opsegu dvostrukog odstupanja od vrednosti *in vivo* dobijenih parametara, ali je samo za ovaj profil  $PIK_{0-\infty}$  vrednost bila u opsegu dvostruke *in vivo* vrednosti (Slika 49 i Tabela 31). Prema tome, predviđeni profili koji su zasnovani na profilima brzine rastvaranja furosemida u medijumu *FeSSIFs* sa 0,1% polisorbata 80 najbolje oslikavaju *in vivo* ponašanje furosemida nakon oralne primene u postprandijalnim uslovima.

Bez obzira na dobro slaganje predviđenih farmakokinetičkih parametara sa *in vivo* vrednostima prema pomenutim kriterijumima, u postprandijalnom stanju nije predviđeno smanjenje obima apsorpcije, izraženo kao  $PIK_{0-\infty}$  vrednost, koje je zabeleženo u literaturi (Tabela 24).

Tabela 30. Prikaz vrednosti farmakokinetičkih parametara predviđenih na osnovu profila brzine rastvaranja furosemida iz ispitivanih uzoraka tableta u “pojednostavljenim” fiziološki zasnovanim medijuma koji simuliraju preprandijalne uslove i vrednosti uočene pri preprandijalnim uslovima *in vivo*

Medijum	Parametar	Preparat	predviđena vrednost ( <i>in silico</i> )	stvarna vrednost ( <i>in vivo</i> ) <sup>a</sup>	greška predviđanja
<i>FaSSIFb</i>	$C_{max}$ (µg/ml)	F1	0,8	0,753 (0,52-1,7)	1,06
		F2	0,81		1,08
<i>FaSSIFs</i> sa 0,05% NaLS		F1	0,8		1,06
		F2	0,8		1,06
<i>FaSSIFs</i> sa 0,05% polisorbata 80		F1	0,76		1,01
		F2	0,79		1,05
<i>FaSSIFb</i>	$t_{max}$ (h)	F1	1,38	1,125 (0,5-2,38)	1,23
		F2	1,36		1,21
<i>FaSSIFs</i> sa 0,05% NaLS		F1	1,38		1,23
		F2	1,38		1,23
<i>FaSSIFs</i> sa 0,05% polisorbata 80		F1	1,36		1,21
		F2	1,36		1,21
<i>FaSSIFb</i>	$PIK_{0-\infty}$ (µg h/ml)	F1	2,61	2,43 (1,24-2,80)	1,07
		F2	2,63		1,08
<i>FaSSIFs</i> sa 0,05% NaLS		F1	2,63		1,08
		F2	2,63		1,08
<i>FaSSIFs</i> sa 0,05% polisorbata 80		F1	2,49		1,02
		F2	2,58		1,06
<i>FaSSIFb</i>	F %	F1	54,20	27,2-80,5	/
		F2	54,5		
<i>FaSSIFs</i> sa 0,05% NaLS		F1	54,5		
		F2	54,5		
<i>FaSSIFs</i> sa 0,05% polisorbata 80		F1	51,54		
		F2	53,51		

<sup>a</sup>vrednost se odnosi na *in vivo* profil srednjih koncentracij furosemida u preprandijalnim uslovima preuzet iz ref. (519), u zagradi je dat opseg individualnih vrednosti za  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-\infty}$

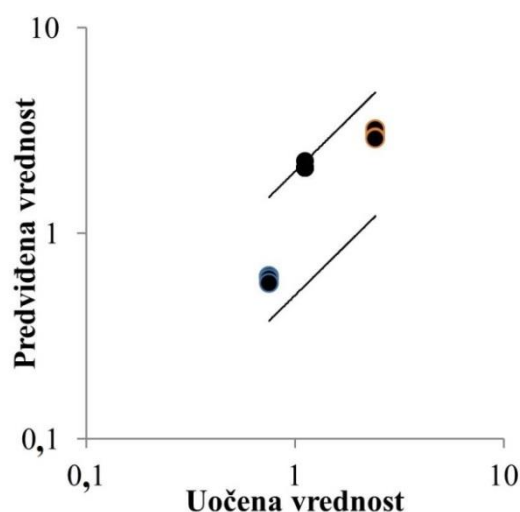


Slika 48. Poređenje vrednosti farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-\infty}$ ) predviđenih na osnovu profila brzine rastvaranja furosemda iz ispitivanih uzoraka tableta u “pojednostavljenim” fiziološki zasnovanim medijuma i *in vivo* uočenih vrednosti ovih parametara nakon oralne primene furosemda u uslovima na gladno (Studija A)

Tabela 31. Prikaz vrednosti farmakokinetičkih parametara predviđenih na osnovu profila brzine rastvaranja furosemda iz ispitivanih uzoraka tableta u “pojednostavljenim” fiziološki zasnovanim medijuma koji simuliraju uslove u postprandijalnom stanju i vrednosti uočenih *in vivo* u postprandijalnim uslovima

Medijum	Parametar	Preparat	predviđena vrednost ( <i>in silico</i> )	stvarna vrednost ( <i>in vivo</i> ) <sup>b</sup>	greška predviđanja	
<i>FeSSIFb</i>	$C_{max}$ (µg/ml)	F1	0,62	0,43 (0,23-0,77)	1,44	
		F2				
<i>FeSSIFs</i> sa 0,1% NaLS		F1	0,6		1,40	
		F2				
<i>FeSSIFs</i> sa 0,1% polisorbata 80		F1	0,6		1,40	
		F2	0,57		1,33	
<i>FeSSIFb</i>	$t_{max}$ (h)	F1	2,08	2,38 (1,88-3,25)	0,87	
		F2				
<i>FeSSIFs</i> sa 0,1% NaLS		F1	2,24		0,94	
		F2				
<i>FeSSIFs</i> sa 0,1% polisorbata 80		F1	2,24		0,94	
		F2	2,08		0,87	
<i>FeSSIFb</i>	$PIK_{0-\infty}$ (µg h/ml)	F1	3,1	1,46 (1,22-3,1)	2,12	
		F2	3,2		2,19	
<i>FeSSIFs</i> sa 0,1% NaLS		F1	3,1		2,12	
		F2	3,2		2,19	
<i>FeSSIFs</i> sa 0,1% polisorbata 80		F1	2,92		2	
		F2	2,89		1,98	
<i>FeSSIFb</i>	F %	F1	55,48	26,7-79,7	/	
		F2				
<i>FeSSIFs</i> sa 0,1% NaLS		F1	53,84			/
		F2				
<i>FeSSIFs</i> sa 0,1% polisorbata 80		F1	53,84			/
		F2	51,2			/

<sup>b</sup> vrednost se odnosi na *in vivo* profil srednjih koncentracij furosemda u postprandijalnim uslovima preuzet iz ref. (519), u zagradi je dat opseg individualnih vrednosti za  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-\infty}$



Slika 49. Poređenje vrednosti farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-\infty}$ ) predviđenih na osnovu profila brzine rastvaranja furosemda iz ispitivanih uzoraka tableta u “pojednostavljenim” fiziološki zasnovanim medijuma i *in vivo* uočenih vrednosti ovih parametara nakon oralne primene furosemda u postprandijalnim uslovima (Studija A)

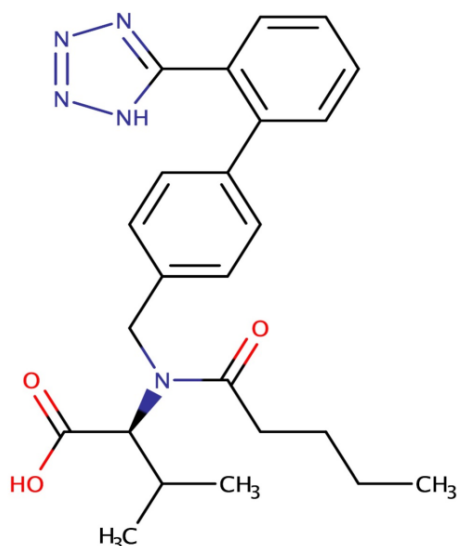
Tabela 32. Uticaj hrane na apsorpciju furosemda – odnos vrednosti osnovnih farmakokinetičkih parametara u uslovima primene nakon obroka i primene na gladno

Uslovi ispitivanja	Odnos vrednosti parametra postprandijalno/preprandijalno		
	$C_{max}$	$t_{max}$	$PIK_{0-\infty}$
<i>In vivo</i> (Studija A)	0,57	1,29	0,6
<i>FeSSIFb/FaSSIFb</i>	0,78 (F1 i F2)	1,51 (F1), 1,53 (F2)	1,19 (F1), 1,22 (F2)
<i>FeSSIFs/FaSSIFs</i> sa dodatkom NaLS	0,78 (F1 i F2)	1,53 (F1), 1,51 (F2)	1,18 (F1), 1,22 (F2)
<i>FeSSIFs/FaSSIFs</i> sa dodatkom polisorbata 80	0,79 (F1), 0,72 (F2)	1,62 (F1), 1,53 (F2)	1,17 (F1), 1,12 (F2)

Kao što je već pomenuto, furosemid je slaba kiselina i sa porastom pH vrednosti medijuma se očekuje i povećanje njegove rastvorljivosti kao preduslov za apsorpciju u tankom crevu. Rezultati PBPK simulacije su pokazali da prisustvo hrane dovodi do povećanja  $t_{max}$ , ali ne utiče značajno na obim apsorpcije ove lekovite supstance što nije u skladu sa rezultatima *in vivo* studija.

### 5.4.3. Valsartan

Valsartan je nepeptidni antagonist angiotenzina II (Slika 50). Koristi se u terapiji hipertenzije, kao i posle infarkata miokarda da bi se smanjila smrtnost kod pacijenata sa disfunkcijom leve srčane komore i kod zatajivanja srca. Početna doza u terapiji hipertenzije je 80 mg jednom dnevno, a može se, ukoliko je potrebno, povećati na 160 mg jednom dnevno. Kod pacijenata koji su imali infarkt miokarda se inicijalno primenjuje 20 mg valsartana dva puta dnevno, a doza se može postepeno povećati na 160 mg dva puta dnevno. Kod zatajivanja srca se inicijalno primenjuje 40 mg valsartana dva puta dnevno, a doza se može postepeno povećati na 160 mg dva puta dnevno (318).



(2S)-3-metil-2-[pentanoil-[[4-[2-(2H-tetrazol-5-il)fenil]fenil]metil]amino]butanska kiselina

Slika 50. Strukturna formula i hemijski naziv valsartana

#### Fizičko-hemijske i biofarmaceutske karakteristike

Valsartan ima dve kisele funkcionalne grupe, tetrazol ( $pK_a = 4,73$ ) i karboksilnu grupu ( $pK_a = 3,9$ ), zbog kojih je visoko rastvorljiv u vodenim rastvorima  $pH \geq 5$ , a nisko rastvorljiv pri nižim  $pH$  vrednostima (527). Medarević i saradnici (256) su pokazali da je rastvorljivost valsartana u medijumu  $pH 1,2$   $0,079$  mg/ml, dok su u medijumima  $pH 4,5$  i  $6,8$  izmerene vrednosti za rastvorljivost bile  $0,956$  i  $11,316$  mg/ml, redom. Dakle, prisustvo dve kisele grupe u njegovoj strukturi dovodi do povećanja rastvorljivosti sa porastom  $pH$  GIT-a. Međutim, prisustvo dve funkcionalne grupe koje su jonizovane pri  $pH$  vrednostima koje postoje u tankom crevu smanjuju permeabilnost valsartana kroz intestinalnu membranu.

Prema rezultatima klasterovanja i klasifikacije sprovedenim u okviru ovog istraživanja (poglavlje 5.2.2.) valsartan je grupisan sa srednje permeabilnim lekovitim supstancama ( $P_{eff}$  vrednosti od  $1,15 \times 10^{-4}$  do  $2,61 \times 10^{-4}$  cm/s). Naime, valsartan se u fiziološkom opsegu  $pH$  vrednosti nalazi uglavnom u jonizovanom obliku što otežava njegov prolazak kroz intestinalnu membranu putem pasivne difuzije (256, 527, 528). Iz tog razloga, valsartan ima apsorpcioni prozor u proksimalnom delu GIT-a gde se dovoljan procenat lekovite supstance nalazi u nejonizovanom obliku, koji je dostupan za apsorpciju. Međutim, rastvorljivost valsartana u ovom delu GIT-a je niska što dovodi do niske oralne biorasploživosti (oko 23% za kapsule i 39% za rastvor) (256, 527, 529).

Prema literaturnim podacima prisustvo hrane dovodi do smanjenja koncentracije valsartana u plazmi u periodu od 0 do 6h posle oralne primene, dok su koncentracije valsartana u plazmi od 6 do 24h slične u preprandijalnom i postprandijalnom stanju (530, 531). Hamed i saradnici (532) su, koristeći *in vitro* model transfera, zaključili da bi prisustvo hrane trebalo da pozitivno utiče na apsorpciju valsartana. Primenom RF modela razvijenog u okviru ovog istraživanja (poglavlje 5.3.) valsartan je klasifikovan u  $FE_{\downarrow}$  klasu (negativan efekat hrane) zbog njegove niske permeabilnosti i niskog obima metabolizma i visokog odnosa doza/rastvorljivost koji ukazuju na potencijalni uticaj hrane na apsorpciju leka.

#### *In vivo* podaci

U Tabeli 33 prikazani su rezultati farmakokinetičkih *in vivo* studija nakon intravenske i oralne primene različitih farmaceutskih oblika valsartana. Prikazani rezultati ukazuju na smanjeni obim i brzinu apsorpcije iz čvrstih farmaceutskih oblika u odnosu na oralno primenjen rastvor. Brzina

apsorpcije je smanjena u slučaju primene nakon obroka. U studiji Wu i saradnika (533) je pokazano da prisustvo hrane dovodi do značajnog produženja  $t_{max}$  i smanjena  $C_{max}$ , ali smanjenje  $PIK_{0-\infty}$  nije bilo značajno.

Tabela 33. Valsartan – rezultati *in vivo* studija

Oznaka studije	Farmaceutski oblik leka	Doza (mg)	$PIK_{0-\infty}$ ( $\mu\text{g h/ml}$ )	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$t_{max}$ (h)	Broj ispitanika	Ref.
A	bolus injekcija	20	10,10	3,94	/	12	(527)
	kapsula	80	9,73	1,53	1,95	12	
	oralni rastvor	80	15,17	3,11	1,43	12	
B	tableta	160	34,58	2,91	3,96	24	(534)
C	kapsula	200	22,07	3,33	2,08	16	(535)
D	kapsula	80	13,70	2,12	3,50	48	(533)
	kapsula (nakon obroka)	80	13,60	1,29	5,75	30	

#### *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja

*In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja valsartana sprovedeno je za dva uzorka komercijalno dostupnih preparata tipa tableta sa dozvolom za lek u Bosni i Hercegovini koji sadrže 160 mg valsartana. Sastav ispitivanih preparata prikazan je u Tabeli 34.

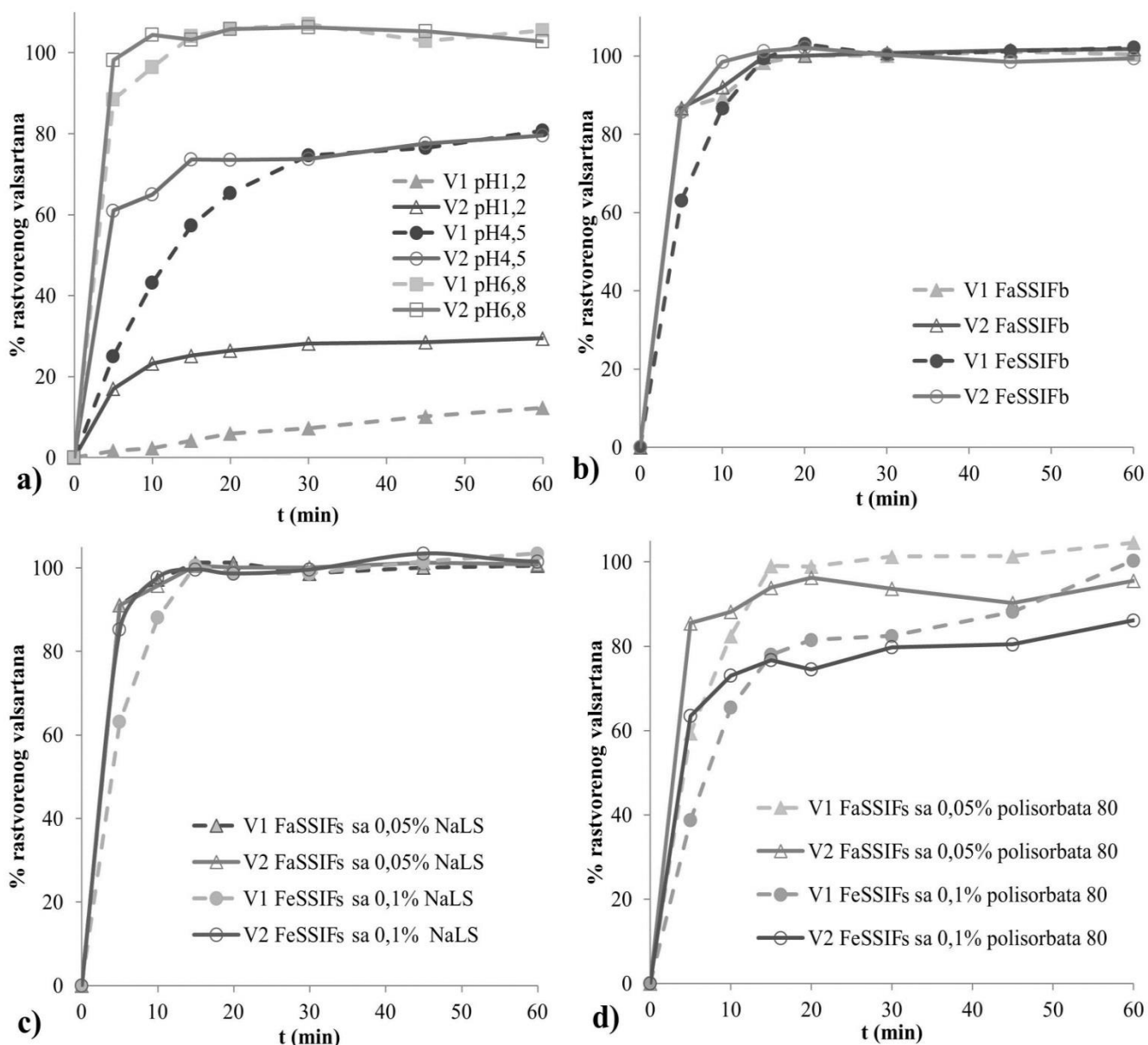
U pitanju su film tablete gotovo identičnog sastava koje sadrže laktozu monohidrat i mikrokristalnu celulozu kao sredstva za dopunjavanje, povidon kao sredstvo za vezivanje, kroskarmelozu-natrijum kao superdezintegrator i hipromelozu kao sredstvo za oblaganje. Razlike u formulaciji se ogledaju u sastavu filma, s obzirom da je u uzorku V1 prisutan makrogol 4000, dok je u uzorku V2 prisutan makrogol 8000, a umesto crvenog željezo-oksida, uzorak V2 sadrži titan-dioksid.

Tabela 34. Sastav ispitivanih tableta valsartana

Uzorak V1	Uzorak V2
laktoza monohidrat magnezijum-stearat povidon mikrokristalna celuloza umrežena karmeloza-natrijum bezvodni koloidni silicijum- dioksid hipromeloza titanijum-dioksid (E171) žuti željezo-oksidi (E172) crveni željezo-oksidi (E172) makrogol 4000	laktoza monohidrat magnezijum-stearat povidon mikrokristalna celuloza umrežena karmeloza-natrijum bezvodni koloidni silicijum- dioksid hipromeloza titanijum-dioksid (E171) žuti željezo-oksidi (E172) talk makrogol 8000

Na Slici 51 su prikazani eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja valsartana iz tableta sa trenutnim oslobađanjem u različitim medijumima. Rastvaranje valsartana iz tableta u medijumu pH 1,2 je bilo sporo i nepotpuno (18,6% nakon 120 min za V1 i 33% nakon 120 min za V2). U medijumu pH 6,8 rastvaranje valsartana iz tableta je bilo veoma brzo i potpuno, dok je u medijumu pH 4,5 više od 85% supstance iz oba preparata rastvoreno u intervalu od 90 do 120 minuta. Takođe, brzina rastvaranja valsartana iz uzorka tableta V2 u medijumima pH 1,2 i pH 4,5 je bila

značajno veća nego iz uzorka tableta V1 ( $f_2 < 50$ ), iako nisu uočene značajne razlike u pogledu kvalitativnog sastava preparata. Povećanje količine rastvorenog valsartana iz tableta sa porastom pH vrednosti medijuma je u skladu sa porastom rastvorljivosti lekovite supstance. Rastvaranje valsartana iz obe formulacije je bilo veoma brzo i potpuno u svim ispitivanim “pojednostavljenim” fiziološki zasnovanim medijumima, osim u *FeSSIFs* sa 0,1% polisorbata 80 (iz formulacije V1 se više od 85% supstance oslobodilo između 30 i 45 min, a iz formulacije V2 između 45 i 60 min). Sporije oslobađanje lekovite supstance u medijumima sa polisorbatom 80 u odnosu na medijume sa NaLS su zapazili i drugi autori (536, 537), koji su objasnili da je ovakvo ponašanje verovatno posledica veće molekulske mase polisorbata 80 (1310 g/mol) u poređenju sa NaLS (288,4 g/mol), kao i veće mase micela (polisorbat 80: 76000 g/mol, NaLS: 15900 g/mol) što dovodi do sporije difuzije lek-micela kompleksa, a time i smanjenja brzine rastvaranja lekovite supstance iz farmaceutskog oblika.



Slika 51. Profili brzine rastvaranja valsartana iz tableta u različitim medijumima: a) medijumi pH 1,2; pH 4,5; pH 6,8; b) *FaSSIFb* i *FeSSIFb*; c) “pojednostavljeni“ fiziološki zasnovani medijumi sa NaLS; d) “pojednostavljeni“ fiziološki zasnovani medijumi sa polisorbatom 80



## Razvoj i validacija PBPK modela

Za razvoj modela za predviđanje *in vivo* ponašanja valsartana nakon intravenske primene i oralne primene na gladno, odnosno nakon uzimanja obroka su korišteni ulazni parametri prikazani u Tabeli 35.

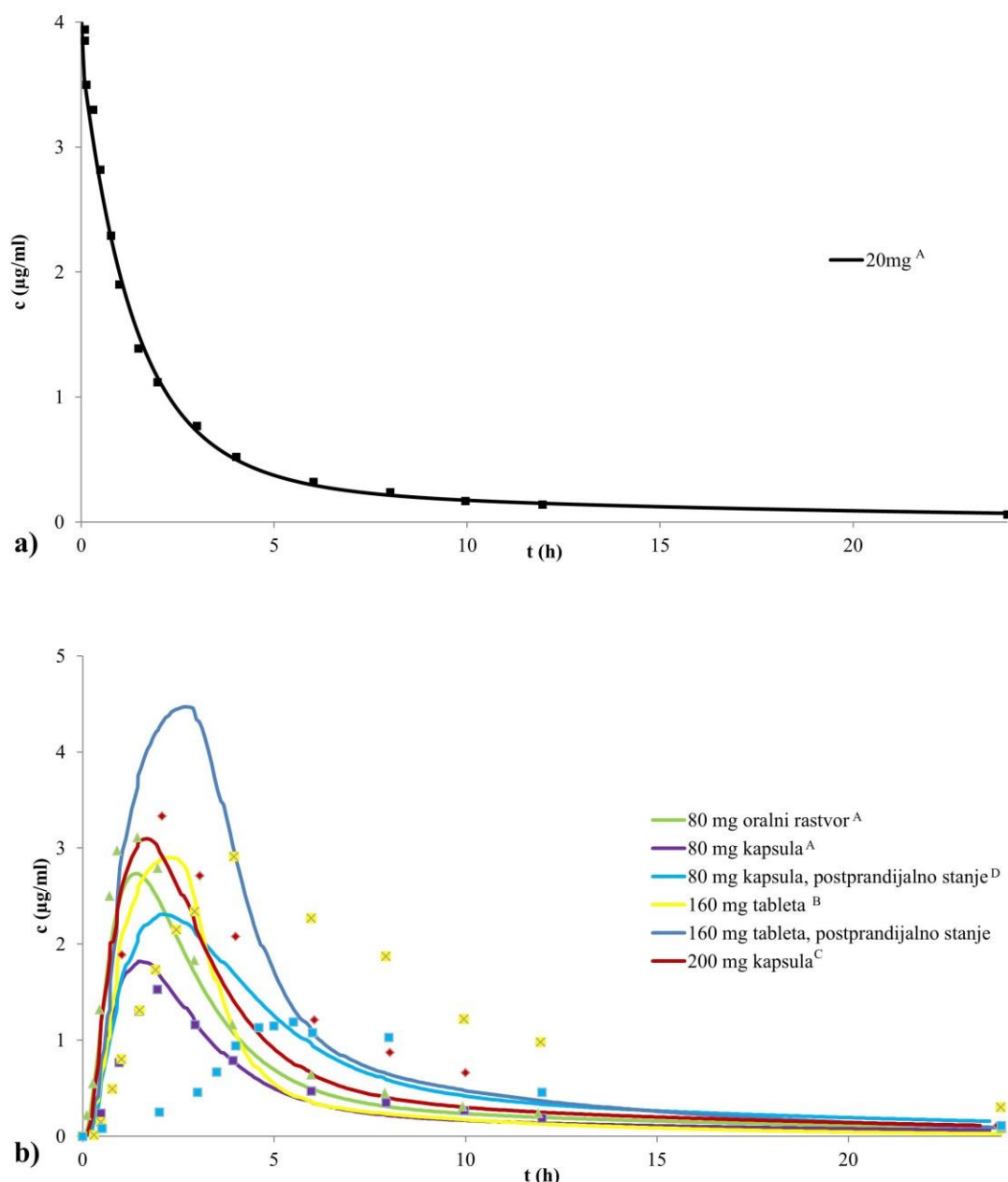
Prilikom razvoja modela uzeta je u obzir i pH-zavisna rastvorljivost valsartana u fiziološkom opsegu pH vrednosti i *in silico* je simuliran efekat žučnih soli na rastvorljivost i difuzioni koeficijent valsartana (integrisana GastroPlus™ softverska opcija). Prema literaturnim podacima valsartan podleže enterohepatičnoj recirkulaciji (538), te je u model uključena i enterohepatična recirkulacija, koja prema standardnim GastroPlus™ postavkama podrazumeva da se 75% žuči preusmerava u žučnu kesu, dok se ostatak od 25% kontinuirano izlučuje u duodenum, gde je dostupan za reapsorpciju (Tabela 35). Takođe, faktori proporcionalnosti koji opisuju brzinu apsorpcije lekovite supstance po regionima GIT-a (engl. *Absorption scale factor, ASF*), su optimizovani da bi se uzeo u obzir apsorpcioni prozor valsartana u proksimalnom delu GIT-a (Tabela 35). Farmakokinetički profil valsartana je u literaturi opisan dvoprostornim modelom (539).

Tabela 35. Ulazni parametri korišteni za razvoj PBPK modela valsartana

Parametar	Vrednost
Molekulska masa (g/mol)	436
log <i>D</i>	-0,34 (pH 7,0) <sup>a</sup>
pKa	3,9; 4,73 <sup>b</sup>
<i>P</i> <sub>eff</sub> (× 10 <sup>-4</sup> cm/s), transcelularna permeabilnost	0,6068 <sup>c</sup>
Oralne doze (mg)	80, 160, 200
Intravenske doze (mg)	20
Referentna rastvorljivost (mg/ml)	0,079 (pH 1,2) <sup>d</sup>
Srednje vreme precipitacije (s)	900 <sup>e</sup>
Koeficijent difuzije (× 10 <sup>-5</sup> cm <sup>2</sup> /s)	0,6285 <sup>f</sup>
Gustina čestica lekovite supstance (g/ml)	1,2 <sup>e</sup>
Efektivni radijus čestica (μm)	25 <sup>e</sup>
Odnos koncentracije leka u krvi/plazmi	0,6 <sup>g</sup>
Slobodna frakcija leka u plazmi, <i>f</i> <sub>u</sub> (%)	5 <sup>h</sup>
Klirens, CL (l/h/kg)	0,023 <sup>d</sup>
Renalni klirens, CL <sub>ren</sub> (l/h/kg)	0,008 <sup>b</sup>
Volumen distribucije, <i>V</i> <sub>c</sub> (l/kg)	0,067 <sup>d</sup>
Konstanta distribucije, <i>k</i> <sub>1/2</sub> (1/h)	0,248 <sup>d</sup>
Konstanta distribucije, <i>k</i> <sub>2/1</sub> (1/h)	0,114 <sup>d</sup>
ASF	2,78 (duodenum) <sup>e</sup> ; 2,7 (jejunum 1) <sup>e</sup> ; 0 (jejunum 2- ascendentni kolon) <sup>i</sup>
Vreme simulacije (h)	24

<sup>a</sup>Vrednost preuzeta iz ref. (540); <sup>b</sup>Vrednosti preuzete iz ref. (527); <sup>c</sup>Izračunata vrednost na osnovu permeabilnosti na Caco-2 ćelijama (541) pomoću GastroPlus™ integrisanog konvertera za permeabilnost; <sup>d</sup>Vrednost preuzeta iz ref. (256); <sup>e</sup>GastroPlus™ vrednost; <sup>f</sup>GastroPlus™ procenjena vrednost; <sup>g</sup>Vrednost preuzeta iz ref.(542); <sup>h</sup>Vrednost preuzeta iz ref.(543); <sup>i</sup>Optimizovana vrednost

*In silico* predviđeni profili koncentracije valsartana u plazmi nakon intravenske primene i oralne primene na gladno, odnosno nakon uzimanja obroka su prikazani na Slici 52 zajedno sa profilima srednjih koncentracija valsartana u plazmi uočenim u okviru *in vivo* studija.

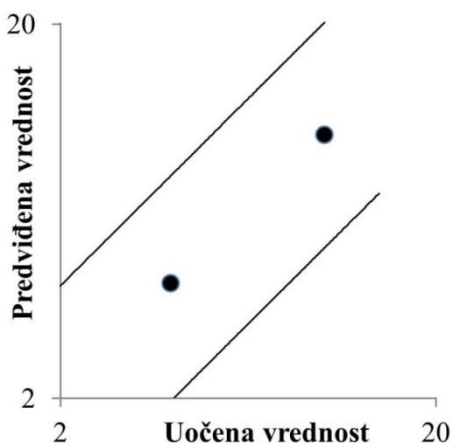


Slika 52. Predviđeni (linije) i *in vivo* (simboli) profili srednjih koncentracija valsartana u plazmi nakon primene: a) bolus injekcije; b) različitih oralnih preparata

U cilju validacije PBPK modela izvršeno je i poređenje predviđenih i *in vivo* uočenih vrednosti farmakokinetičkih parametara. U tabelama 36 i 37 i na slikama 53 i 54 se može videti da su predviđeni farmakokinetički parametri za intravensku i oralnu primenu u preprandijalnim uslovima bili u opsegu dvostruke vrednosti *in vivo* uočenih parametara, izuzev  $PIK_{0-\infty}$  vrednosti za profil simuliran za tablete od 160 mg, koja je bila nešto ispod donje granice dvostrukog odstupanja od *in vivo* vrednosti. Međutim, autori su naveli da se opseg  $PIK_{0-\infty}$  vrednosti u *in vivo* studiji kretao od 7,50 do 42,22  $\mu\text{gh/ml}$  što je verovatno posledica velike interindividulane varijabilnosti. Predviđena  $PIK_{0-\infty}$  vrednost za profil simuliran za tablete jačine 160 mg se nalazi u pomenutom opsegu *in vivo* vrednosti, pa se može smatrati zadovoljavajućom. Visoka vrednost koeficijenta korelacije ( $R^2 > 0,99$ ) ukazuje na linearnu zavisnost između predviđenih i *in vivo* vrednosti farmakokinetičkih parametara uočenih nakon oralne primene tableta valsartana u preprandijalnim uslovima (Slika 54).

Tabela 36. Poređenje predviđenih i *in vivo* uočenih vrednosti farmakokinetičkih parametara nakon intravenske primene valsartana

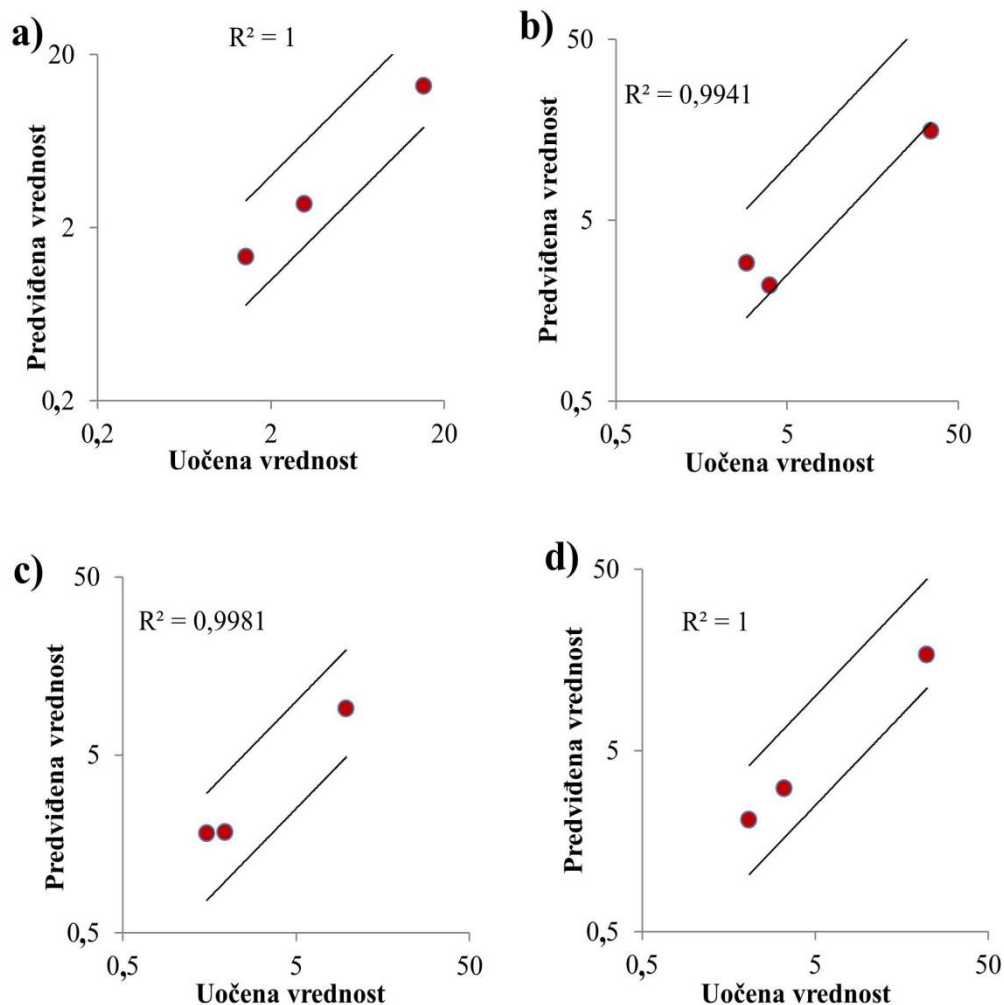
	Parametar	stvarna vrednost ( <i>in vivo</i> )	predviđena vrednost ( <i>in silico</i> )	greška predviđanja
Studija A 20 mg bolus injekcija	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	3,94	4,06	1,03
	$PIK_{0-\infty}$ ( $\mu\text{g h/mL}$ )	10,10	10,12	1



Slika 53. Poređenje predviđenih i *in vivo* uočenih farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$  i  $PIK_{0-\infty}$ ) nakon primene 20 mg bolus injekcije valsartan (Studija A)

Tabela 37. Poređenje predviđenih i *in vivo* uočenih vrednosti farmakokinetičkih parametara nakon oralne primene valsartana pri preprandijalnim uslovima

	Parametar	stvarna vrednost ( <i>in vivo</i> )	predviđena vrednost ( <i>in silico</i> )	greška predviđanja
Studija A 80 mg oralni rastvor	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	3,11	2,73	0,88
	$t_{max}$ (h)	1,43	1,36	0,95
	$PIK_{0-\infty}$ ( $\mu\text{g h/ml}$ )	15,17	13,22	0,87
	Fa %	/	38,11	/
	F %	/	38,11	/
Studija A 80 mg kapsula	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	1,53	1,82	1,19
	$t_{max}$ (h)	1,95	1,84	0,94
	$PIK_{0-\infty}$ ( $\mu\text{g h/ml}$ )	9,73	9,12	0,94
	Fa %	/	26,28	/
	F %	/	26,28	/
Studija B 160 mg tableta	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	2,91	2,90	1
	$t_{max}$ (h)	3,96	2,18	0,55
	$PIK_{0-\infty}$ ( $\mu\text{g h/ml}$ )	34,58	15,56	0,45
	Fa %	/	23,16	/
	F %	/	23,16	/
Studija C 200 mg kapsula	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	3,33	3,10	0,93
	$t_{max}$ (h)	2,08	2,08	1
	$PIK_{0-\infty}$ ( $\mu\text{g h/ml}$ )	22,07	16,92	0,77
	Fa %	/	20,04	/
	F %	/	20,04	/

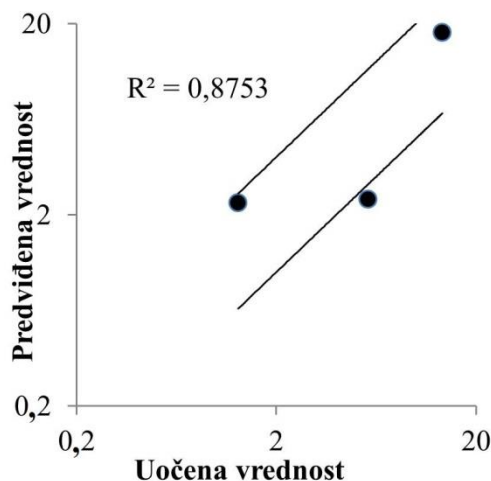


Slika 54. Poređenje predviđenih i *in vivo* učenih vrednosti farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-\infty}$ ) nakon oralne primene preparata valsartana u uslovima na gladno: a) 80 mg oralni rastvor (Studija A); b) 80 mg kapsula (Studija A); c) 160 mg tableta (Studija B); d) 200 mg kapsula (Studija C)

Tabela 38. Poređenje predviđenih i *in vivo* učenih vrednosti farmakokinetičkih parametara nakon oralne primene valsartana pri postprandijalnim uslovima

	Parametar	stvarna vrednost ( <i>in vivo</i> )	predviđena vrednost ( <i>in silico</i> )	greška predviđanja
80 mg kapsula	$C_{max}$ (µg/ml)	1,29 <sup>a</sup>	2,31	1,79
	$t_{max}$ (h)	5,75 <sup>a</sup>	2,40	0,41
	$PIK_{0-\infty}$ (µg h/ml)	13,60 <sup>a</sup>	17,86	1,31
	Fa %	/	49,61	/
	F %	/	49,59	/

vrednost se odnosi na profil srednje koncentracija valsartana u plazmi očitana iz ref: <sup>a</sup>(533)

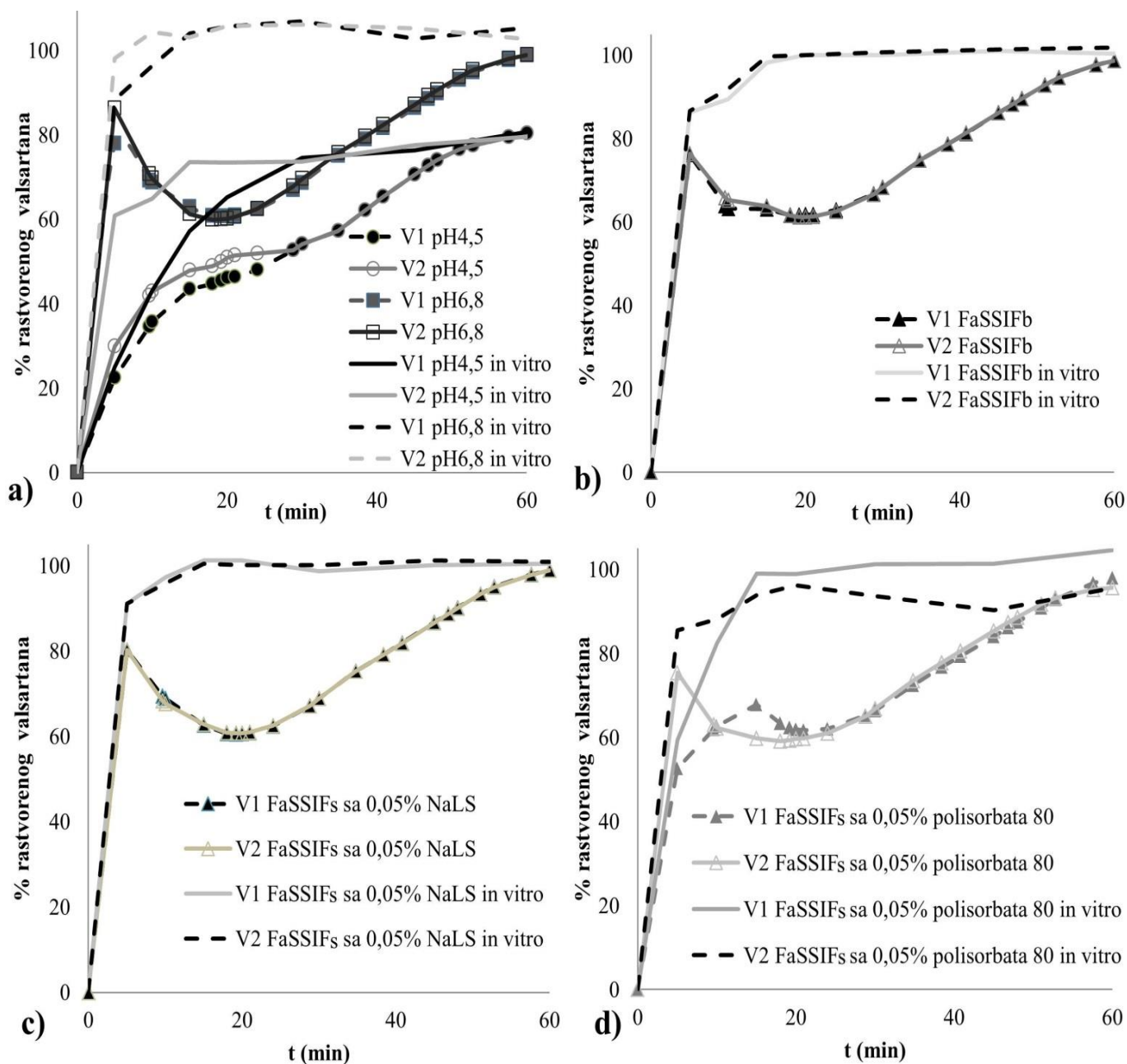


Slika 55. Poređenje predviđenih i *in vivo* uočenih vrednosti farmakokinetičkih parametara ( $C_{\max}$ ,  $t_{\max}$  i  $PIK_{0-\infty}$ ) nakon oralne primene 80 mg kapsule valsartana u postprandijalnim uslovima (Studija D)

*In silico* predviđene vrednosti farmakokinetičkih parametara posle primene kapsule od 80 mg pri postprandijalnim uslovima su upoređeni sa farmakokinetičkim parametrima iz nedavno objavljene *in vivo* studije (533). U Tabeli 38 i na Slici 55 se može videti da su  $C_{\max}$  i  $PIK_{0-\infty}$  vrednosti u ospegu dvostrukog odstupanja od *in vivo* uočenih vrednosti, dok je predviđena vrednost za  $t_{\max}$  na donjoj granici dvostrukog odstupanja od *in vivo* vrednosti. U literaturi nisu dostupni podaci o uticaju hrane na apsorpciju valsartana posle primene tableta od 160 mg, te nije bilo moguće izvršiti direktno poređenje predviđenih sa *in vivo* profilima.

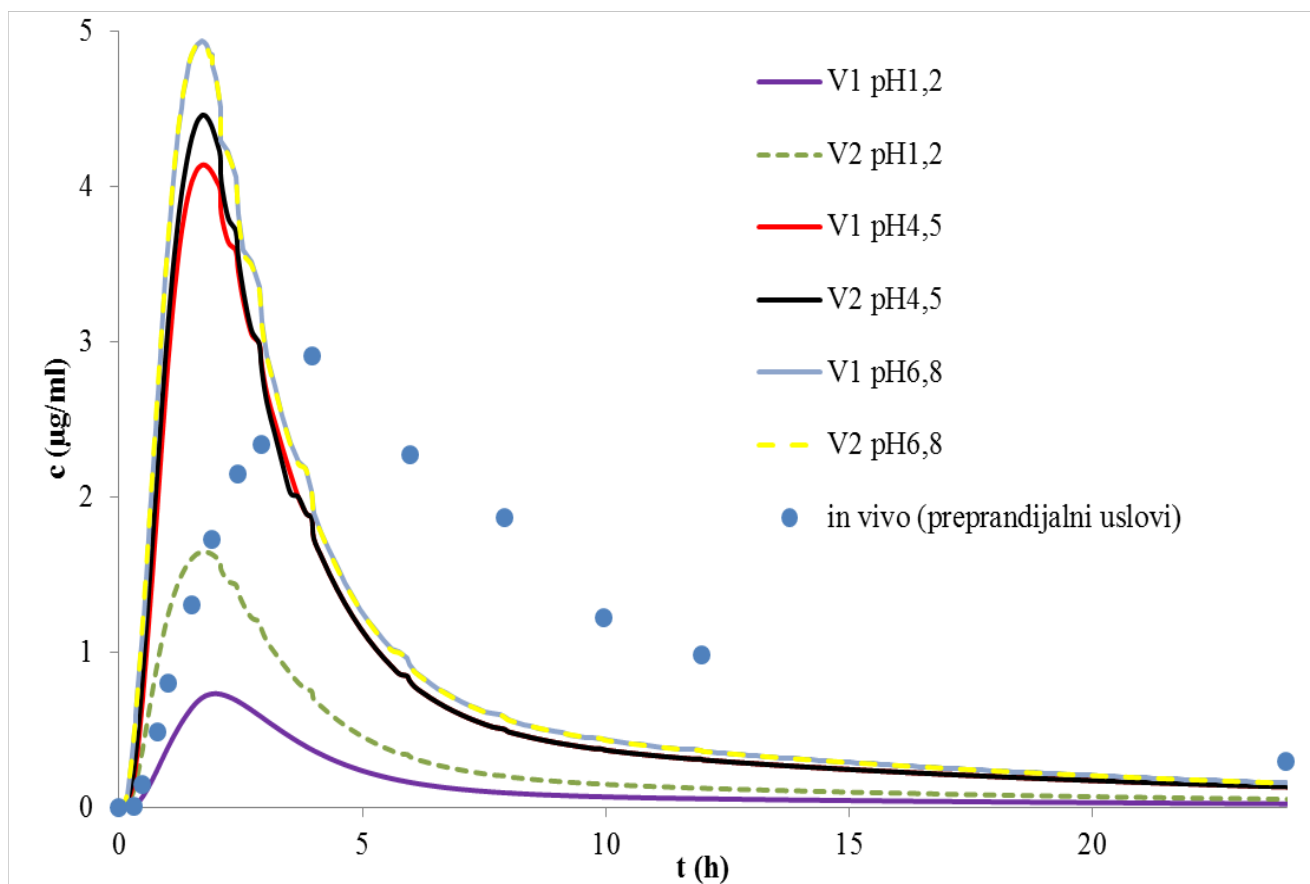
#### Primena PBPK modela

Primenom PBPK modela u kombinaciji sa eksperimentalno određenim profilima brzine rastvaranja valsartana iz tableta u različitim medijumima, predviđeni su profili rastvaranja *in vivo* u preprandijalnim i postprandijalnim uslovima. Na predviđenim profilima brzine rastvaranja valsartana za preprandijalno stanje, koji su dobijeni primenom PBPK modela, se može uočiti značajno sporije rastvaranje lekovite supstance iz tableta u poređenju sa odgovarajućim *in vitro* profilima (Slika 56). Sa druge strane, predviđeni profili brzine rastvaranja valsartana u postprandijalnim uslovima su bili identični odgovarajućim *in vitro* profilima. Kao što je detaljno diskutovano kod furosemida (poglavlje 5.4.2.), ovakvo ponašanje valsartana *in vivo*, kao slabe kiseline, je očekivano.



Slika 56. Profili brzine rastvaranja valsartana iz tableta u različitim medijumima uočeni *in vitro* i predviđeni pomoću PBPK modela: a) medijumi pH 4,5; pH 6,8; b) *FaSSIFb*; c) “pojednostavljeni“ fiziološki zasnovani medijumi sa NaLS; d) “pojednostavljeni“ fiziološki zasnovani medijumi sa polisorbatom 80

Predviđeni profili koncentracije valsartana u plazmi, koji su zasnovani na profilima brzine rastvaranja valsartana iz analiziranih komercijalno dostupnih tableta u medijumima različitih pH vrednosti (1,2, 4,5 i 6,8), kao i *in vivo* uočen profil koncentracije valsartana u plazmi nakon primene tableta od 160 mg u preprandijalnim uslovima (Studija B) su prikazani na Slici 57. Razlike u brzini rastvaranja valsartana iz ispitivanih preparata u medijumima različitih pH vrednosti značajno su uticale na *in silico* predviđene vrednosti  $C_{max}$  i  $PIK_{0-\infty}$  (Tabela 39). Najniže vrednosti pomenutih parametara su predviđene za medijum pH 1,2 u kojem je rastvaranje valsartana iz oba preparata bilo sporo i nepotpuno. Razlike u brzini rastvaranja između ispitivanih preparata u ovom medijumu su se takođe odrazile na predviđene vrednosti  $C_{max}$  i  $PIK_{0-\infty}$  valsartana, koje su više od dva puta veće u slučaju preparata V2.  $C_{max}$  i  $PIK_{0-\infty}$  vrednosti predviđene na osnovu profila brzine rastvaranja valsartana iz tableta u medijumu pH 4,5 su više od dva puta veće od vrednosti predviđenih na osnovu profila brzine rastvaranja valsartana iz tableta u medijumu pH 1,2. Najviše vrednosti ovih farmakokinetičkih parametara su predviđene za medijum pH 6,8 u kojem je rastvaranje valsartana iz obe formulacije bilo veoma brzo i potpuno. Takođe, predviđene  $C_{max}$  i  $PIK_{0-\infty}$  vrednosti za medijume pH 4,5 i 6,8 su u opsegu, a predviđene  $t_{max}$  vrednosti su na donjoj granici dvostrukog odstupanja od srednje vrednosti *in vivo* dobijenih parametara (Tabela 39 i Slika 58). Dobijeni rezultati ukazuju da bi medijumi pH 4,5 i pH 6,8 mogli da se koriste kao biorelevantni za ispitivanje brzine rastvaranja valsartana iz konvencionalnih tableta u preprandijalnim uslovima.



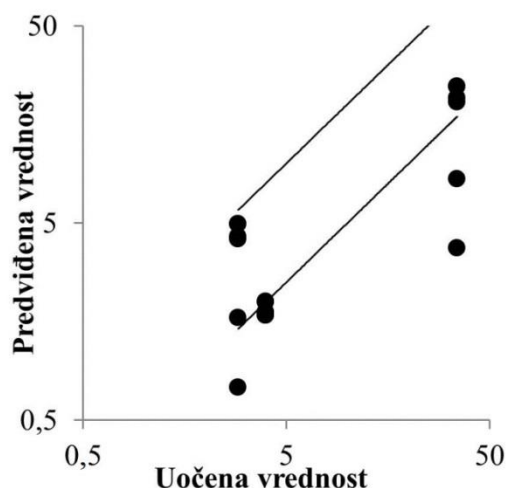
Slika 57. Predviđeni profili koncentracije valsartana u plazmi zasnovani na profilima brzine rastvaranja valsartana iz komercijalno dostupnih tableta jačine 160 mg u medijumima različitih pH vrednosti i *in vivo* profil srednjih koncentracija valsartana u plazmi nakon oralne primene u preprandijalnim uslovima (534)

Tabela 39. Prikaz vrednosti farmakokinetičkih parametara predvidenih na osnovu profila brzine rastvaranja valsartana iz ispitivanih uzoraka tableta u medijumima različitim pH vrednosti i vrednosti uočenih *in vivo* u preprandijalnim uslovima

Medijum	Parametar	Preparat	predviđena vrednost ( <i>in silico</i> )	stvarna vrednost ( <i>in vivo</i> ) <sup>a</sup>	greška predviđanja		
pH 1,2	C <sub>max</sub> (µg/ml)	V1	0,73	2,91	0,25		
		V2	1,65		0,57		
pH 4,5		V1	4,14		1,42		
		V2	4,25		1,46		
pH 6,8		V1	4,94		1,70		
		V2					
pH 1,2		t <sub>max</sub> (h)	V1		2	3,96	0,51
			V2				
pH 4,5			V1		1,76		0,44
			V2		1,98		0,50
pH 6,8	V1		1,70	0,43			
	V2			0,43			
pH 1,2	PIK <sub>0-∞</sub> (µg h/ml)	V1	3,72	34,58	0,11		
		V2	8,37		0,24		
pH 4,5		V1	20,55		0,59		
		V2	21,49		0,62		
pH 6,8		V1					
		V2	24,64		0,71		
pH 1,2		F %	V1		5,54	oko 23% za kapsule i 39% za rastvor <sup>b</sup>	/
			V2		12,46		
pH 4,5	V1		30,58				
	V2		29,57				
pH 6,8	V1		36,68				
	V2		36,65				

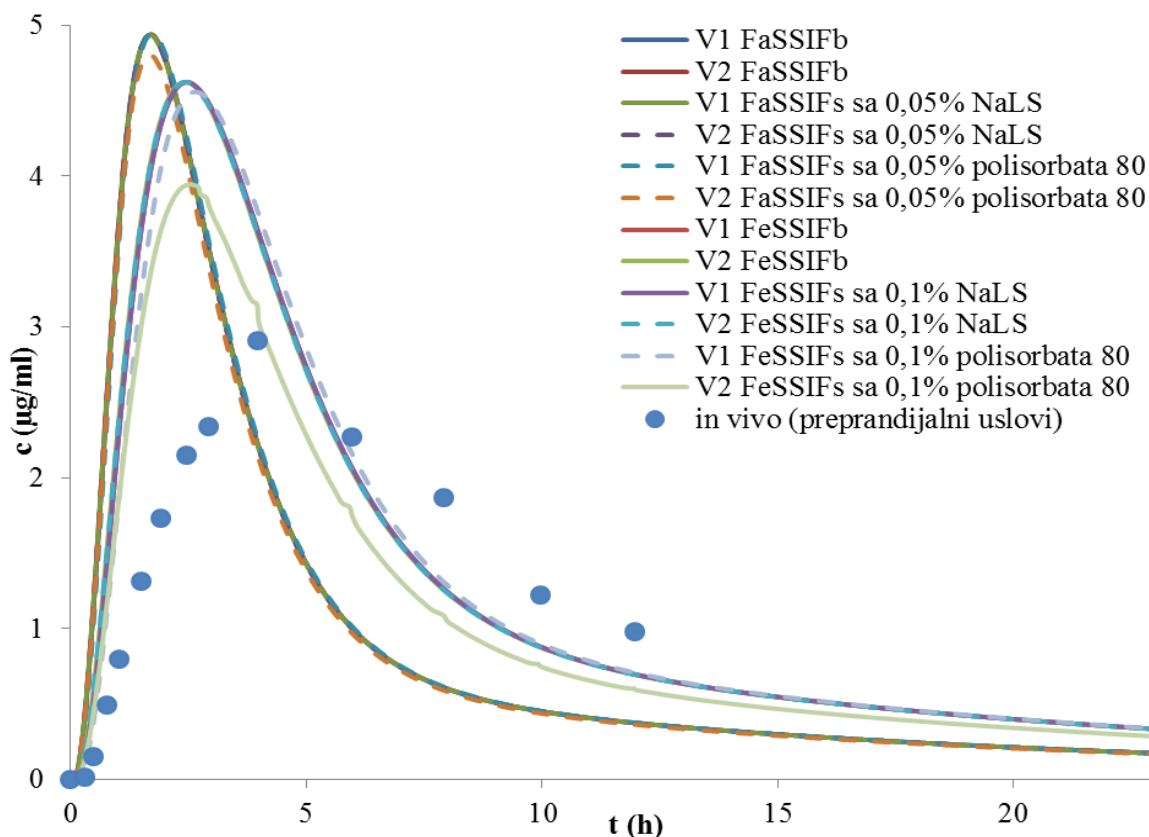
<sup>a</sup>vrednost se odnosi na *in vivo* profil srednjih koncentracija valsartana u preprandijalnim uslovima preuzet iz ref. (534); <sup>b</sup>Vrednost preuzeta iz ref. (527)





Slika 58. Poređenje vrednosti farmakokinetičkih parametara ( $t_{max}$ ,  $C_{max}$  i  $PIK_{0-\infty}$ ) predviđenih na osnovu profila brzine rastvaranja valsartana iz ispitivanih uzoraka tableta u medijumima različitih pH vrednosti i *in vivo* uočenih vrednosti ovih parametara nakon oralne primene valsartana u uslovima na gladno (Studija B);

Na Slici 59 su prikazani predviđeni profili koncentracije valsartana u plazmi za preprandijalno i postprandijalno stanje predviđeni na osnovu profila brzine rastvaranja valsartana u “pojednostavljenim” fiziološki zasnovanim medijumima.



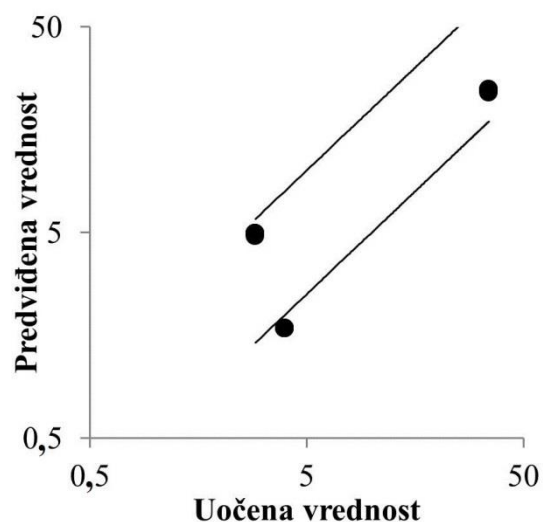
Slika 59. Predviđeni profili koncentracije valsartana u plazmi zasnovani na profilima brzine rastvaranja valsartana iz ispitivanih uzoraka u “pojednostavljenim” fiziološki zasnovanim medijumima i *in vivo* profil srednjih koncentracija valsartana u plazmi nakon oralne primene leka u preprandijalnim uslovima (534)

Primećuje se da su svi predviđeni profili za preprandijalno stanje međusobno slični, kao što je i slučaj sa profilima brzine rastvaranja valsartana iz analiziranih tableta (rastvaranje valsartana iz obe analizirane formulacije je bilo veoma brzo i potpuno). Predviđeni profili za preprandijalno stanje su upoređeni sa *in vivo* uočenim profilom srednjih koncentracija valsartana u plazmi nakon oralne primene tablete od 160 mg u preprandijalnim uslovima, koji je takođe prikazan na Slici 59. U Tabeli 40 i na Slici 60 se uočava da su predviđene  $C_{max}$  i  $PIK_{0-\infty}$  vrednosti za sve profile u opsegu, a  $t_{max}$  vrednosti na donjoj granici odstupanja od srednje vrednosti *in vivo* dobijenih parametara. Dobijeni rezultati ukazuju da bi medijumi *FaSSIFb* i *FaSSIFs* sa 0,05% NaLS i polisorbata 80 mogli da se koriste kao biorelevantni za ispitivanje brzine rastvaranja valsartana iz konvencionalnih tableta u preprandijalnim uslovima.

Tabela 40. Prikaz vrednosti farmakokinetičkih parametara predviđenih na osnovu profila brzine rastvaranja valsartana iz ispitivanih uzoraka tableta u "pojednostavljenim" fiziološki zasnovanim medijuma koji simuliraju preprandijalne uslove i vrednosti uočene pri preprandijalnim uslovima *in vivo*

Medijum	Parametar	Preparat	predviđena vrednost ( <i>in silico</i> )	stvarna vrednost ( <i>in vivo</i> ) <sup>a</sup>	greška predviđanja	
<i>FaSSIFb</i>	$C_{max}$ (µg/ml)	V1	4,94	2,91	1,70	
		V2				
<i>FaSSIFs</i> sa 0,05% NaLS		V1				
		V2	4,80		1,65	
<i>FaSSIFs</i> sa 0,05% polisorbata 80		V1				
		V2				
<i>FaSSIFb</i>	$t_{max}$ (h)	V1	1,70	3,96	0,43	
		V2				
<i>FaSSIFs</i> sa 0,05% NaLS		V1				
		V2	24,66			0,71
<i>FaSSIFs</i> sa 0,05% polisorbata 80		V1				
		V2				
<i>FaSSIFb</i>	$PIK_{0-\infty}$ (µg h/ml)	V1	24,66	34,58	0,71	
		V2				
<i>FaSSIFs</i> sa 0,05% NaLS		V1				
		V2	24,71		0,71	
<i>FaSSIFs</i> sa 0,05% polisorbata 80		V1	23,92		0,69	
		V2				
<i>FaSSIFb</i>	F %	V1	36,71	oko 23% za kapsule i 39% za rastvor <sup>b</sup>	/	
		V2	36,70			
<i>FaSSIFs</i> sa 0,05% NaLS		V1	36,67			
		V2	36,68			
<i>FaSSIFs</i> sa 0,05% polisorbata 80		V1	36,77			
		V2	35,61			

<sup>a</sup>vrednost se odnosi na *in vivo* profil srednjih koncentracija valsartana u preprandijalnim uslovima preuzet iz ref. (534); <sup>b</sup>Vrednost preuzeta iz ref. (527)



Slika 60. Poređenje vrednosti farmakokinetičkih parametara ( $t_{max}$ ,  $C_{max}$  i  $PIK_{0-\infty}$ ) predviđenih na osnovu profila brzine rastvaranja valsartana iz ispitivanih uzoraka tableta u "pojednostavljenim" fiziološki zasnovanim medijuma i *in vivo* uočenih vrednosti ovih parametara nakon oralne primene valsartana u uslovima na gladno (Studija B)

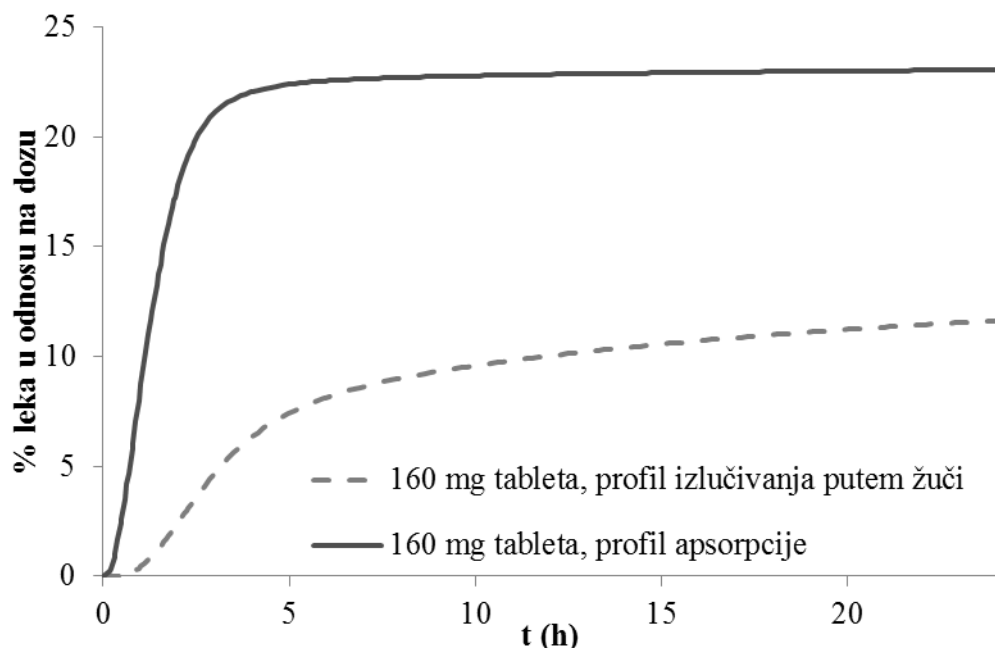
Predviđeni profili za postprandijalno stanje su takođe međusobno slični izuzev profila za formulaciju V2, koji je simuliran na osnovu profila brzine rastvaranja valsartana iz tablete u medijumu *FeSSIFs* sa 0,1% polisorbata 80 (Slika 59 i Tabela 41). Ovo je očekivano s obzirom na to da je i brzina rastvaranja valsartana iz formulacije V2 u ovom medijumu bila manja u odnosu na ostale medijume (više od 85% supstance se oslobodilo između 45 i 60 min). Prema rezultatima simulacije prisustvo hrane dovodi do značajnog povećanja u obimu apsorpcije valsartana tj. odnos predviđenih  $PIK_{0-\infty}$  vrednosti za postprandijalno i preprandijalno stanje je bio veći od 1,2 (Tabela 42). Generalno, podaci o efektu hrane na apsorpciju valsartana su neujednačeni i kontradiktorni. Prema literaturnim podacima prisustvo hrane dovodi do smanjenja bioraspoloživosti valsartana za čak 46%. Navodi se da se ovo smanjenje dešava uglavnom u periodu od 0 do 6 h posle oralne primene, dok su srednje koncentracije valsartana u plazmi od 6 do 24 h slične u preprandijalnom i postprandijalnom stanju (530). Nije navedeno na koji se farmaceutski oblik i dozu ovi podaci odnose. U sažetku karakteristika leka za tablete valsartana Diovan<sup>®</sup> (Novartis Pharmaceuticals Corp.) iz 2011. godine se navodi da prisustvo hrane dovodi do smanjenja  $PIK$  vrednosti za oko 40% i  $C_{max}$  za oko 50% (531). U sažetku karakteristika leka za Diovan<sup>®</sup> (Novartis Pharmaceuticals Corp.) iz 2015. godine se pak navodi da uzimanje ovog leka sa hranom dovodi do smanjenja  $PIK$  za 48% i da je nakon 8 h koncentracija valsartana u plazmi slična koncentraciji u preprandijalnom stanju. Proizvođač dalje navodi sa su ovi podaci dobijeni za kapsule, a da efekat hrane na apsorpciju valsartana iz tableta nije procenjivan (544). Sa druge strane, u već pomenutoj *in vivo* studiji (Studija D) (533) za kapsule od 80 mg je odnos uočenih  $PIK_{0-\infty}$  vrednosti za preprandijalno i postprandijalno stanje bio 0,99 (Tabela 42). Xiao i saradnici (545) su sugerisali da bi kod lekova kao što je valsartan, koji se delimično izlučuju putem žuči, negativan efekat hrane na bioraspoloživost mogao biti posledica povećanog lučenja žuči što bi posledično povećalo i njihovu eliminaciju ovim putem. Međutim, valsartan podleže enterohepatičnoj recirkulaciji. Povećano izlučivanje putem žuči dovodi i do njegove reapsorpcije, što se može videti i na Slici 61. Dakle, povećano izlučivanje valsartana putem žuči i njegova reapsorpcija bi, pored povećane rastvorljivosti i brzine rastvaranja valsartana iz tableta sa porastom pH vrednosti, mogli da bude razlog zašto su rezultati simulacije pokazali povećan obim apsorpcije valsartana u postprandijalnom stanju.

Tabela 41. Prikaz vrednosti farmakokinetičkih parametara predviđenih na osnovu profila brzine rastvaranja valsartana iz ispitivanih uzoraka tableta u “pojednostavljenim” fiziološki zasnovanim medijumima koji simuliraju uslove u postprandijalnom stanju

Medijum	Parametar	Preparat	predviđena vrednost (in silico)	
<i>FeSSIFb</i>	$C_{max}$ (µg/ml)	V1	4,62	
		V2		
V1				
V2				
<i>FeSSIFs</i> sa 0,1% NaLS		V1	4,56	
		V2		
<i>FeSSIFs</i> sa 0,1% polisorbata 80		V1	2,66	
		V2	2,56	
<i>FeSSIFb</i>		$t_{max}$ (h)	V1	2,45
			V2	
<i>FeSSIFs</i> sa 0,1% NaLS	V1		36,16	
	V2			
<i>FeSSIFs</i> sa 0,1% polisorbata 80	V1		31,14	
	V2			
<i>FeSSIFb</i>	F %	V1	53,32	
		V2	53,32	
<i>FeSSIFs</i> sa 0,1% NaLS		V1	53,32	
		V2		
<i>FeSSIFs</i> sa 0,1% polisorbata 80		V1	53,32	
		V2	45,92	

Tabela 42. Uticaj hrane na apsorpciju valsartana – odnos vrednosti osnovnih farmakokinetičkih parametara u uslovima primene nakon obroka i primene na gladno

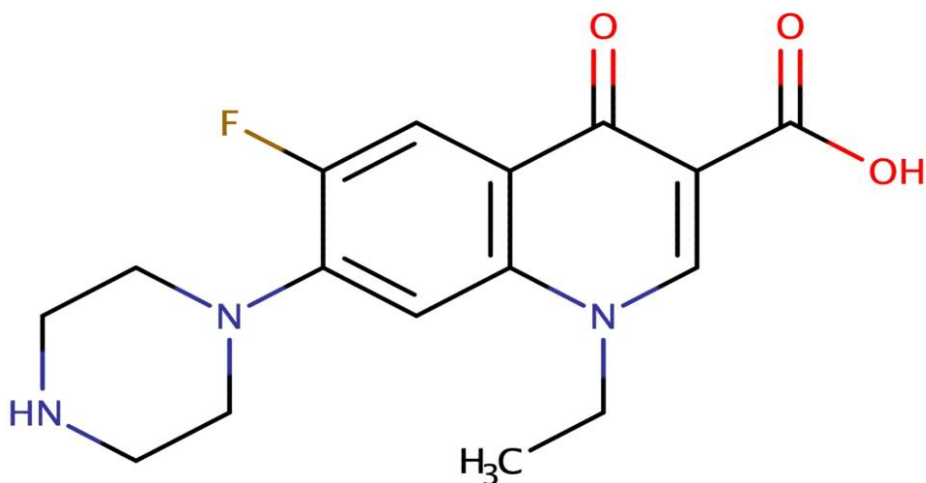
Uslovi ispitivanja	Odnos vrednosti parametra postprandijalno/preprandijalno		
	$C_{max}$	$t_{max}$	$PIK_{0-\infty}$
<i>In vivo</i> (Studija D)	0,6	1,64	0,99
<i>FeSSIFb</i> / <i>FaSSIFb</i>	0,94 (V1 i V2)	1,44 (V1 i V2)	1,47 (V1 i V2)
<i>FeSSIFs</i> / <i>FaSSIFs</i> sa dodatkom NaLS	0,94 (V1 i V2)	1,44 (V1 i V2)	1,47 (V1 i V2)
<i>FeSSIFs</i> / <i>FaSSIFs</i> sa dodatkom polisorbata 80	0,92 (V1)	1,56 (V1)	1,47 (A1)
	0,82 (V2)	1,51 (V2)	1,30 (A2)



Slika 61. Predviđeni profili apsorpcije i izlučivanja valsartana putem žuči nakon primene tablete od 160 mg u preprandijalnim uslovima

#### 5.4.4. Norfloksacin

Norfloksacin je fluorohinolonski antibakterijski lek (Slika 62), koji se koristi u lečenju urinarnih infekcija i gonoreje. Uobičajna doza u lečenju urinarnih infekcija je 400 mg dva puta dnevno, u trajanju od tri do deset dana. U terapiji nekomplikovane gonoreje se primenjuje jedna doza od 800 mg (318).



**1-etil-6-fluoro-4-okso-7-piperazin-1-il-hinolin-3-carboksilna kiselina**

Slika 62. Strukturna formula i hemijski naziv norfloksacina

#### *Fizičko-hemijske i biofarmaceutske karakteristike*

Norfloksacin u svojoj strukturi ima jednu kiselu ( $pK_a = 6,23$ ) i jednu baznu ( $pK_a = 8,51$ ) funkcionalnu grupu i u fiziološkom opsegu pH vrednosti se uglavnom nalazi u cviterjonskom obliku (546). Ahumada i saradnici (547) su pokazali da u fiziološkom opsegu pH vrednosti

rastvorljivost norfloksacina opada sa porastom pH vrednosti; 97,37 (pH 5,43), 58,29 (pH 5,47), 32,99 (pH 5,62), 23 (pH 5,71), 6,02 (pH 5,8), 0,94 (pH 6,28), 0,42 (pH 6,94), 0,31 (pH 7,0) i 0,42 (pH 7,1). Ukoliko se uzmu u obzir navedeni podaci za rastvorljivost, norfloksacin u dozi od 400 mg ne ispunjava zahteve za visoku rastvorljivost na pH 6,8. Particioni koeficijent (logP) norfloksacina je -0,43 (548), dok je na pH 6,8 određen distribicioni koeficijent ( $\log D_{\text{pH } 6,8}$ ) od -0,92 (549) što ukazuje na izrazito hidrofilnu prirodu ove lekovite supstance. U studiji *in situ* intestinalne perfuzije na pacovu je izmerena jejunalna permeabilnost od  $0,104 \times 10^{-4}$  cm/s (550). U biofarmaceutskom smislu norfloksacin je u literaturi opisan kao nisko rastvorljiva/nisko permeabilna lekovita supstanca, koja se primarno apsorbira putem pasivne difuzije (237, 551, 552).

Prema rezultatima klasterovanja i klasifikacije sprovedene u okviru ovog istraživanja (poglavlje 5.2.2.) norfloksacin je grupisan sa srednje permeabilnim lekovitim supstancama ( $P_{\text{eff}}$  vrednosti od  $1,15 \times 10^{-4}$  do  $2,61 \times 10^{-4}$  cm/s). U literaturi je navedeno da je biološka raspoloživost norfloksacina oko 30 do 40% (553).

U literaturi je opisano značajno smanjenje brzine i obima apsorpcije kod istovremene primene norfloksacina sa mlekom i jogurtom (554). Primenom RF modela razvijenog u okviru ovog istraživanja (poglavlje 5.3.) klasifikovan je u FE↓ klasu supstanci kod kojih se ispoljava negativan efekat hrane zbog njegove niske permeabilnosti i niskog obima metabolizma i visokog D/S odnosa.

#### *In vivo podaci*

U Tabeli 43 prikazani su rezultati farmakokinetičkih *in vivo* studija nakon oralne primene preparata norfloksacina. U literaturi nema dostupnih *in vivo* rezultata za intravensku primenu norfloksacina.

Tabela 43. Norfloksacin– rezultati *in vivo* studija

Oznaka studije	Farmaceutski oblik leka	Doza (mg)	PIK <sub>0-∞</sub> (µg h/ml)	C <sub>max</sub> (µg/ml)	t <sub>max</sub> (h)	Broj ispitanika	Ref.
A	tablete	200	3,9	0,75	1	10	(555)
B	tablete	400	4,78	1,35	1	6	(556)
C	tablete	400	6,59	1,15	1,29	18	(557)
D	tablete	200	3,45	0,64	0,97	7	(554)
	tablete (nakon obroka)	200	1,66	0,3	0,97	7	
	tablete (nakon obroka)	200	1,28	0,27	0,97	7	

Prikazani rezultati pokazuju da je apsorpcija norfloksacina nakon oralne primene brza (vrednosti t<sub>max</sub> su u svim studijama bile bliske jedinici). Primena leka nakon obroka bila je praćena smanjenim obimom apsorpcije, pri čemu su vrednosti C<sub>max</sub> i PIK<sub>0-∞</sub> bile dvostruko manje u odnosu na primenu leka na gladno. Imajući u vidu da je biološka raspoloživost norfloksacina oko 30-40%, može se očekivati da njegova primena uz obrok predstavlja ozbiljan rizik za postizanje terapijske efikasnosti leka.

#### *In vitro ispitivanje brzine rastvaranja*

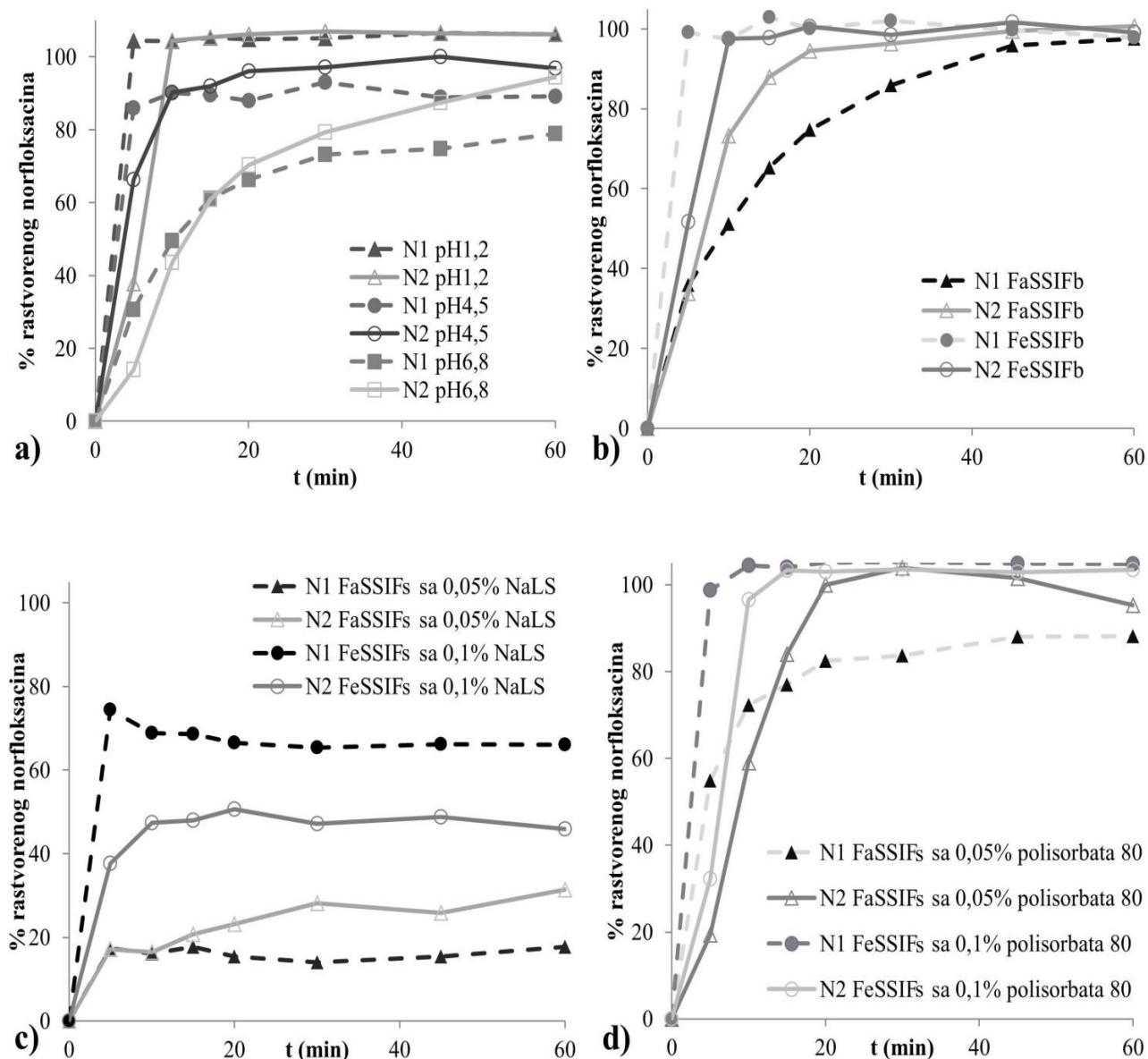
*In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja norfloksacina sprovedeno je za dva uzorka komercijalno dostupnih preparata tipa film tableta sa dozvolom za lek u Bosni i Hercegovini koji sadrže 400 mg norfloksacina. Sastav ispitivanih preparata prikazan je u Tabeli 44.

Tabela 44. Sastav ispitivanih tableta norfloksacina

Uzorak N1	Uzorak N2
laktoza monohidrat magnezijum-stearat povidon kukuruzni skrob makrogol 6000 makrogol 4000	mikrokrystalna celuloza magnezijum-stearat povidon natrijum-skrobglikolat (tip A), bezvodni koloidni silicijum- dioksid prečišćena voda hipromeloza propilenglikol titanijum-dioksid (E171) boja (E110) talk

Iako oba ispitivana preparata predstavljaju film tablete, uočavaju se velike razlike između formulacija, kako u pogledu sastava jezgra, tako i u pogledu sastava filma.

Eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja norfloksacina iz ispitivanih uzoraka tableta u različitim medijumima su prikazani na Slici 63. Ispitivanjem brzine rastvaranja norfloksacina iz tableta je pokazano da obe ispitivane formulacije zadovoljavaju kriterijum za veoma brzo rastvaranje u medijumima pH 1,2 i pH 4,5, dok je oslobađanje u medijumu pH 6,8 bilo značajno sporije. Osim toga, profil brzine rastvaranja iz preparata N2 se značajno razlikovao od preparata N1 ( $f_2 < 50$ ); iz uzorka N2 se više od 85% supstance oslobodilo između 30 i 45 min, a iz uzorka N1 za više od 60 min. Uticaj pH vrednosti na brzinu rastvaranja norfloksacina iz tableta je očekivan s obzirom na to da njegova rastvorljivost opada sa porastom pH vrednosti. U *FeSSIFb* i *FeSSIFs* sa 0,1% polisorbata 80 rastvaranje lekovite supstance iz oba preparata je bilo veoma brzo i potpuno. Sa druge strane, kada je za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance korišten medijum manje zapremine tj. *FaSSIFb*, oslobađanje norfloksacina iz preparata N2 je bilo veoma brzo, dok je oslobađanje iz preparata N1 bilo nešto sporije ( $f_2 = 45,3$ ). Dodatak polisorbata 80 nije doveo do povećanja brzine rastvaranja norfloksacina u odnosu na *FaSSIFb*; brzina rastvaranja iz preparata N1 je čak bila značajno veća u *FaSSIFb* u poređenju sa medijumom sa 0,05% polisorbata 80 ( $f_2 = 44,56$ ). Ipak, u *FaSSIFs* sa 0,05% polisorbata 80 je od 30 do 45 minuta oslobođeno više od 85% lekovite supstance, dok je u prisustvu iste koncentracije NaLS nakon 60 min oslobođeno približno 30% norfloksacina iz oba preparata. Prisustvo NaLS je dovelo i do značajnog smanjenja brzine rastvaranja norfloksacina iz tableta u *FeSSIFs* u odnosu na *FeSSIFb*. Ovaj fenomen su nedavno objasnili Guo i saradnici (558) dajući direktan kristalografski dokaz da između norfloksacina i NaLS nastaje so  $[\text{NORH}^+][\text{LS}^-] \cdot 1,5 \text{ H}_2\text{O}$ , čijom površinom dominiraju hidrofobne metil grupe u NaLS što dovodi do povećane hidrofobnosti i smanjenja kvašenja u vodenom medijumu, što dalje za posledicu ima smanjenu rastvorljivost i brzinu rastvaranja.



Slika 63. Profili brzine rastvaranja norfloksacina iz tableta u različitim medijumima: a) medijumi pH 1,2; pH 4,5; pH 6,8; b) *FaSSIFb* i *FeSSIFb*; c) "pojednostavljeni" fiziološki zasnovani medijumi sa NaLS; d) "pojednostavljeni" fiziološki zasnovani medijumi sa polisorbatom 80



## Razvoj i validacija PBPK modela

Za razvoj modela za predviđanje *in vivo* ponašanja norfloksacina nakon oralne primene na gladno, odnosno nakon uzimanja obroka su korišteni ulazni parametri prikazani u Tabeli 45.

Tokom razvoja modela uzeta je u obzir i pH-zavisna rastvorljivost norfloksacina u fiziološkom opsegu pH vrednosti i *in silico* je simuliran efekat žučnih soli na rastvorljivost i difuzioni koeficijent norfloksacina (integrisana GastroPlus™ softverska opcija). Takođe, kod razvoja modela su uzete u obzir i paracelularna i transcelularna permeabilnost. Iako u literaturi ne postoje precizni podaci o metabolizmu prvog prolaza tj. navodi se samo da se norfloksacin možda delom metaboliše na ovaj način (559), predviđene vrednosti za bioraspoloživost su odgovarale *in vivo* vrednostima (30-40% (553)) tek nakon što je metabolizam prvog prolaza uključen u model, pri čemu je vrednost procenta metabolizovanog leka optimizovana tako da bi se dobio odgovarajući procenat bioraspoloživosti leka i profili koncentracije leka u plazmi (Tabela 45). Farmakokinetički profil norfloksacina u literaturi je opisan dvoprostornim modelom (555).

Tabela 45. Ulazni parametri korišteni za razvoj PBPK modela norfloksacina

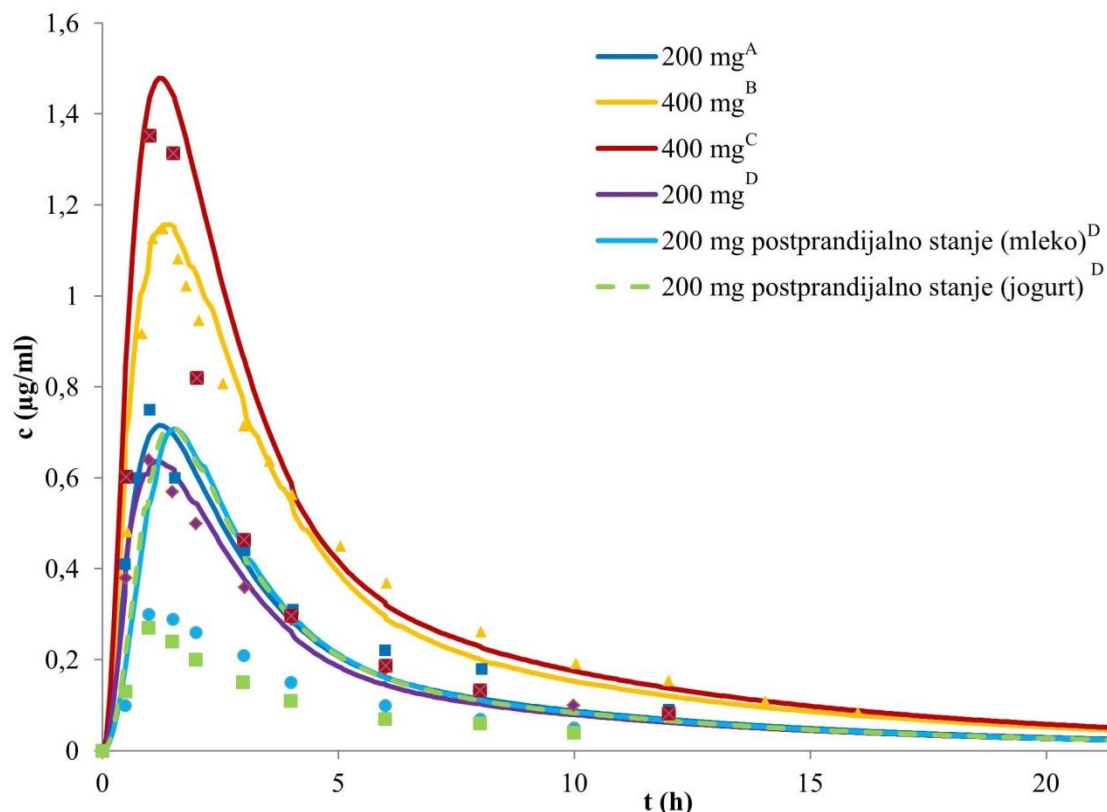
Parametar	Norfloksacin
Molekulska masa (g/mol)	319,33
logP	-0,43 <sup>a</sup>
pKa	6,23; 8,51 <sup>b</sup>
P <sub>eff</sub> (× 10 <sup>-4</sup> cm/s)	0,786 (preprandijalno stanje); 0,966 (postprandijalno stanje) <sup>c</sup>
Doze (mg)	200, 400
Referentna rastvorljivost (mg/ml)	0,42 (pH 7,1) <sup>d</sup>
Srednje vreme precipitacije (s)	900 <sup>e</sup>
Koeficijent difuzije (× 10 <sup>-5</sup> cm <sup>2</sup> /s)	0,7427 <sup>f</sup>
Gustina čestica lekovite supstance (g/ml)	1,20 <sup>e</sup>
Efektivni radijus čestica (µm)	25 <sup>e</sup>
Odnos koncentracije leka u krvi/plazmi	0,827 <sup>g</sup>
Slobodna frakcija leka u plazmi, f <sub>u</sub> (%)	86 <sup>h</sup>
Klirens, CL (l/h/kg)	0,361 <sup>i</sup>
Volumen distribucije, V <sub>c</sub> (l/kg)	0,288 <sup>i</sup>
Konstanta distribucije, k <sub>1/2</sub> (1/h)	1,2 <sup>j</sup>
Konstanta distribucije, k <sub>2/1</sub> (1/h)	0,3 <sup>j</sup>
Efekat prvog prolaza (%)	40 <sup>k</sup>
Vreme simulacije (h)	24

<sup>a</sup>Vrednost preuzeta iz ref. (548); <sup>b</sup>Vrednost preuzeta iz ref. (546); <sup>c</sup>Izračunato na osnovu *in situ* određene permeabilnosti kod pacova (550) pomoću GastroPlus™ integrisanog konvertera za permeabilnost;

<sup>d</sup>Vrednost preuzeta iz ref. (547); <sup>e</sup>GastroPlus™ vrednost; <sup>f</sup>GastroPlus™ procenjena vrednost; <sup>g</sup>Vrednost preuzeta iz ref. (560); <sup>h</sup>Vrednost preuzeta iz ref. (561); <sup>i</sup>Izračunato preko PKPlus™ modula na osnovu *in vivo* profila o koncentraciji leka u plazmi (554-557); <sup>j</sup>PKPlus™ izračunata i optimizovana vrednost;

<sup>k</sup>Optimizovana vrednost

Predviđeni profili koncentracije norfloksacina nakon oralne primene na gladno, odnosno nakon uzimanja obroka su prikazani na Slici 64 zajedno sa *in vivo* uočenim profilima srednjih koncentracija norfloksacina u plazmi preuzetim iz istraživanja Kivisto i saradnika (554).

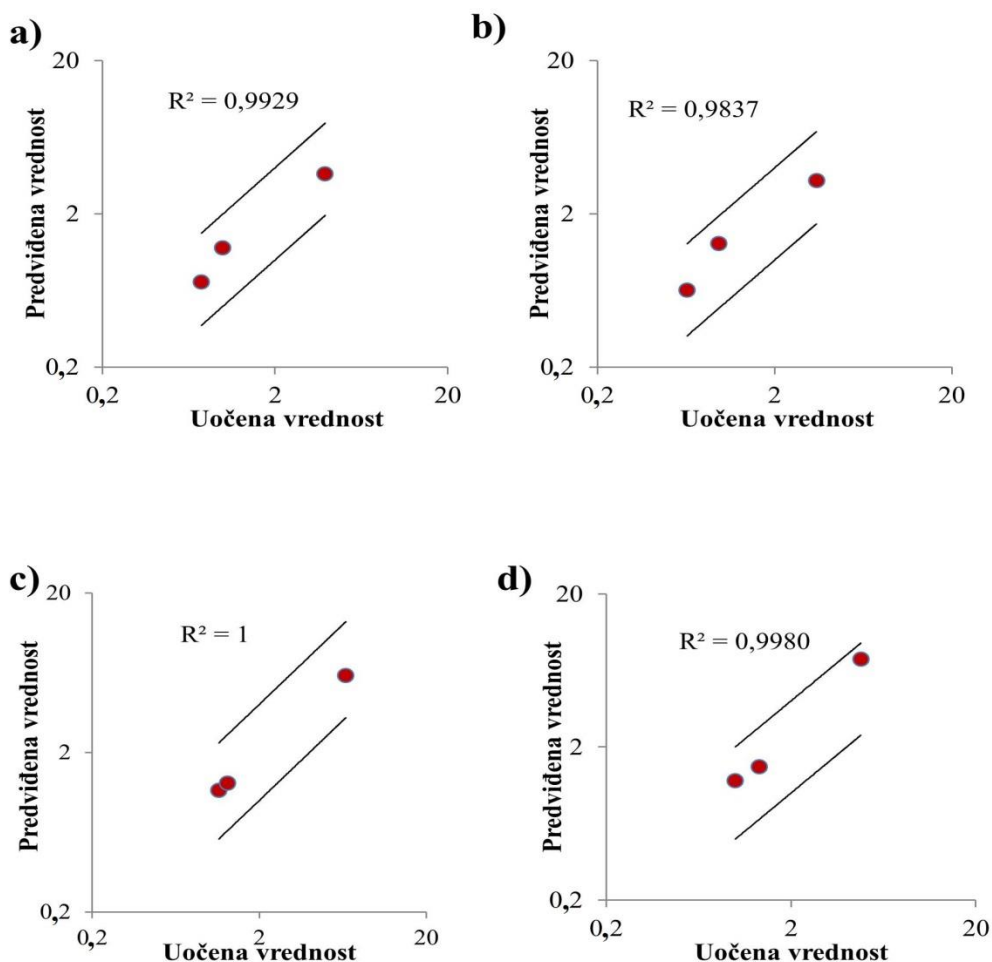


Slika 64. Predviđeni (linije) i *in vivo* (simboli) profili srednjih koncentracija norfloksacina u plazmi nakon primene tableta

U Tabeli 46 i na Slici 65 se može videti da su *in silico* predviđene vrednosti farmakokinetičkih parametara za oralnu primenu leka u preprandijalnim uslovima bili u opsegu dvostruke vrednosti *in vivo* uočenih vrednosti parametara. Takođe, visoka vrednost koeficijenta korelacije ( $R^2 \geq 0,98$ ) ukazuje na linearnu zavisnost između predviđenih i *in vivo* uočenih vrednosti farmakokinetičkih parametara određenih za oralnu primenu leka u preprandijalnim uslovima (Slika 65). Kod oralne primene u postprandijalnim uslovima predviđene vrednosti za  $t_{max}$  su uglavno bile u opsegu dvostruke vrednosti *in vivo* dobijenih parametara (Tabela 47 i Slika 66). Međutim, predviđene vrednosti  $C_{max}$  i  $PIK_{0-\infty}$  su bile na granici ili veće od dvostruke vrednosti ovih parametara uočenih *in vivo* nakon primene tableta norfloksacina sa mlekom ili jogurtom (554). Ovakvi rezultati su verovatno posledica razlike u sastavu obroka. Naime, standardna GastroPlus<sup>TM</sup> postavka za postprandijalno stanje podrazumeva obrok od 200,36 kcal i 30% masti, dok je u pomenutoj *in vivo* studiji mleko sadržalo 201 kcal i 3,9% masti, a jogurt 173,1 kcal i 2,5% masti. Veća kalorijska vrednost obroka podrazumeva i duže vreme zadržavanja leka u želucu, što povećava vrednost  $t_{max}$ . Takođe, Kivisto i saradnici (554) navode da je uzrok negativnog efekta hrane stvaranje helatnog kompleksa norfloksacina sa jonima kalcijuma iz mleka i jogurta, no pomenuta interakcija nije simulirana u ovom *in silico* modelu.

Tabela 46. Poređenje predviđenih i *in vivo* uočenih vrednosti farmakokinetičkih parametara nakon oralne primene norfloksacina pri preprandijalnim uslovima

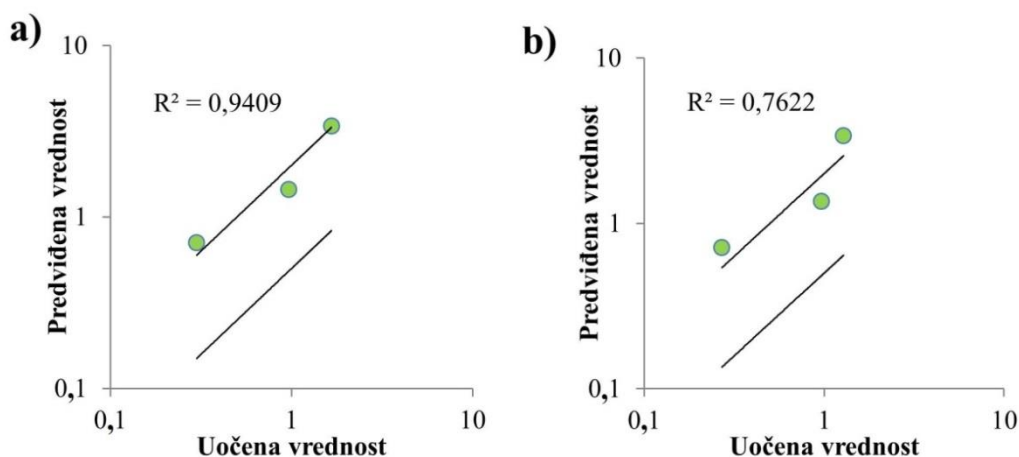
	Parametar	stvarna vrednost ( <i>in vivo</i> )	predviđena vrednost ( <i>in silico</i> )	greška predviđanja
<b>Studija A</b> 200 mg tableta	<b>C<sub>max</sub> (µg/ml)</b>	0,75	0,72	0,95
	<b>t<sub>max</sub> (h)</b>	1	1,20	1,20
	<b>PIK<sub>0-∞</sub> (µg h/ml)</b>	3,90	3,63	0,93
	<b>Fa %</b>	/	71,54	/
	<b>F %</b>	/	42,10	/
<b>Studija B</b> 400 mg tableta	<b>C<sub>max</sub> (µg/ml)</b>	1,15	1,16	1
	<b>t<sub>max</sub> (h)</b>	1,29	1,28	1
	<b>PIK<sub>0-∞</sub> (µg h/ml)</b>	6,59	6,07	0,92
	<b>Fa %</b>	/	70,88	/
	<b>F %</b>	/	41,59	/
<b>Studija C</b> 400 mg tableta	<b>C<sub>max</sub> (µg/ml)</b>	1,35	1,48	1,09
	<b>t<sub>max</sub> (h)</b>	1	1,20	1,20
	<b>PIK<sub>0-∞</sub> (µg h/ml)</b>	4,78	7,47	1,56
	<b>Fa %</b>	/	71,63	/
	<b>F %</b>	/	42,17	/
<b>Studija D</b> 200 mg tableta,	<b>C<sub>max</sub> (µg/ml)</b>	0,64	0,64	1
	<b>t<sub>max</sub> (h)</b>	0,97	1,28	1,32
	<b>PIK<sub>0-∞</sub> (µg h/ml)</b>	3,45	3,28	0,95
	<b>Fa %</b>	/	70,96	/
	<b>F %</b>	/	41,67	/



Slika 65. Poređenje predviđenih i *in vivo* uočenih vrednosti farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-\infty}$ ) nakon oralne primene preparata norfloksacina u uslovima na gladno: a) 200 mg tableta (Studija A); b) 400 mg tableta (Studija B); c) 400 mg tableta (Studija C); d) 200 mg tableta (Studija D)

Tabela 47. Poređenje predviđenih i *in vivo* uočenih vrednosti farmakokinetičkih parametara nakon oralne primene norfloksacina pri postprandijalnim uslovima

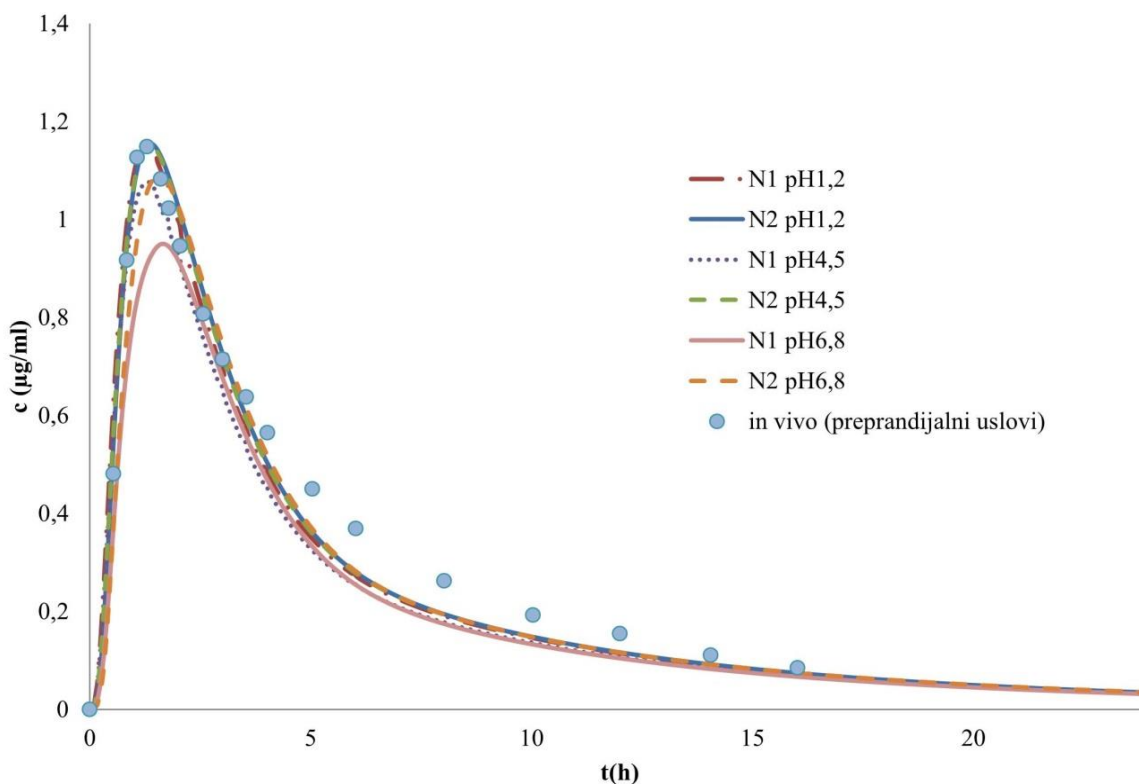
	Parametar	stvarna vrednost ( <i>in vivo</i> )	predviđena vrednost ( <i>in silico</i> )	greška predviđanja
<b>Studija D</b> <b>200 mg tableta,</b> <b>mleko</b>	$C_{max}$ (µg/ml)	0,3	0,71	2,36
	$t_{max}$ (h)	0,97	1,44	1,48
	$PIK_{0-\infty}$ (µg h/ml)	1,66	3,39	2,03
	Fa %	/	73,35	/
	F %	/	43,18	/
<b>Studija D</b> <b>200 mg tableta,</b> <b>jogurt</b>	$C_{max}$ (µg/ml)	0,27	0,71	2,65
	$t_{max}$ (h)	0,97	1,36	1,40
	$PIK_{0-\infty}$ (µg h/ml)	1,28	3,39	2,65
	Fa %	/	73,36	/
	F %	/	43,18	/



Slika 66. Poređenje predviđenih i *in vivo* uočenih vrednosti farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-\infty}$ ) nakon oralne primene tableta norfloksacina u postprandijalnim uslovima: a) 200 mg tableta, mleko (Studija D); b) 200 mg tableta, jogurt (Studija D)

#### Primena PBPK modela

*In silico* predviđeni profili koncentracija norfloksacina u plazmi, koji su zasnovani na profilima brzine rastvaranja norfloksacina iz ispitivanih uzoraka tableta u medijumima različitih pH vrednosti (1,2, 4,5 i 6,8) su pokazali dobro slaganje sa *in vivo* uočenim profilom srednjih koncentracija norfloksacina u plazmi nakon primene tablete od 400 mg u preprandijalnim uslovima (Slika 67).



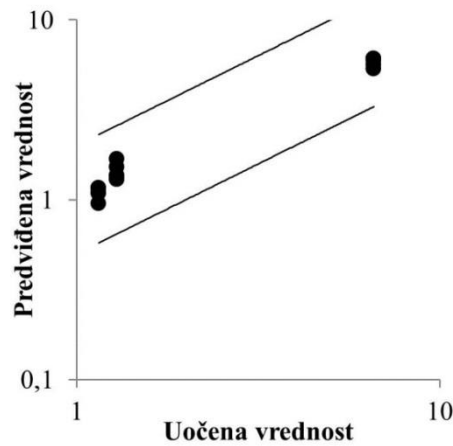
Slika 67. Predviđeni profili koncentracije norfloksacina u plazmi zasnovani na profilima brzine rastvaranja norfloksacina iz ispitivanih uzoraka tableta u medijumima različitih pH vrednosti i *in vivo* profil srednjih koncentracija norfloksacina u plazmi nakon oralne primene u preprandijalnim uslovima (557)

Predviđene vrednosti svih farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-\infty}$ ) su bile u opsegu dvostrukog odstupanja od srednje vrednosti *in vivo* dobijenih parametara (Tabela 48 i Slika 68). Predviđeni profili su bili međusobno slični, izuzev simuliranog profila koncentracije norfloksacina u plazmi za preparat N1 i medijum pH 6,8 za koji je pokazano i nešto sporije rastvaranje lekovite supstance. Takođe, predviđene vrednosti za procenat apsorbovanog leka i biorasploživost su bile slične literaturnim vrednostima, sa izuzetkom vrednosti predviđenih za preparat N1 i medijum pH 6,8, koje su bile nešto niže (Tabela 68). Dobijeni rezultati ukazuju da bi medijumi pH 1,2, 4,5 i 6,8 mogli da se koriste kao biorelevantni za ispitivanje brzine rastvaranja norfloksacina iz konvencionalnih tableta u preprandijalnim uslovima.

Tabela 48. Prikaz vrednosti farmakokinetičkih parametara predviđenih na osnovu profila brzine rastvaranja norfloksacina iz ispitivanih uzoraka tableta u medijumima različitih pH vrednosti i vrednosti uočenih *in vivo* u preprandijalnim uslovima

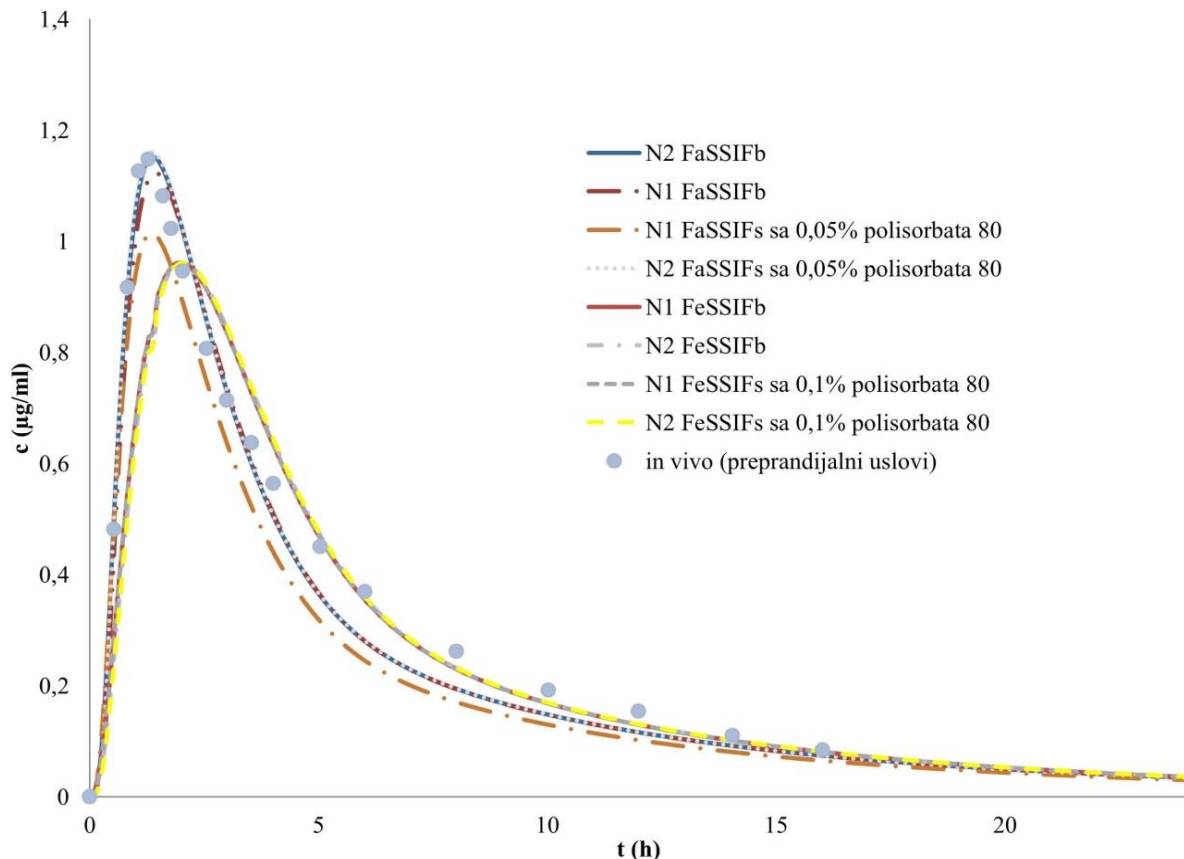
Medijum	Parametar	Preparat	predviđena vrednost ( <i>in silico</i> )	stvarna vrednost ( <i>in vivo</i> ) <sup>a</sup>	greška predviđanje		
pH 1,2	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	N1	1,16	1,15	1,01		
		N2					
pH 4,5		N1	1,08		0,94		
		N2	1,15			1	
pH 6,8		N1	0,95		0,83		
		N2	1,09		0,95		
pH 1,2		$t_{max}$ (h)	N1		1,29	1,29	1
			N2		1,36		1,05
pH 4,5			N1		1,29		1
			N2		1,36		1,05
pH 6,8			N1		1,68		1,30
			N2		1,52		1,18
pH 1,2	$PIK_{0-\infty}$ ( $\mu\text{g h/ml}$ )	N1	6,07	6,59	0,92		
		N2					
pH 4,5		N1	5,64		0,86		
		N2	6,06		0,92		
pH 6,8		N1	5,34		0,81		
		N2	5,95		0,90		
pH 1,2		Fa %	N1		70,88	75% <sup>b</sup>	/
			N2		70,87		
pH 4,5	N1		65,90				
	N2		70,75				
pH 6,8	N1		62,37				
	N2		69,45				
pH 1,2	F %	N1	41,59	30 - 40% <sup>c</sup>	/		
		N2	41,58				
pH 4,5		N1	38,67				
		N2	41,50				
pH 6,8		N1	36,54				
		N2	40,68				

<sup>a</sup>vrednost se odnosi na *in vivo* profil srednjih koncentracija norfloksacina u preprandijalnim uslovima preuzet iz ref.(557); <sup>b</sup>Vrednost preuzeta iz ref.(237); <sup>c</sup>Vrednost preuzeta iz ref. (553)



Slika 68. Poređenje vrednosti farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-\infty}$ ) predviđenih na osnovu profila brzine rastvaranja norfloksacina iz ispitivanih uzoraka tableta u medijumima različitih pH vrednosti i *in vivo* uočenih vrednosti ovih parametara nakon oralne primene norfloksacina u uslovima na gladno (Studija C)

Na Slici 69 su prikazani *in silico* predviđeni profili koncentracije norfloksacina u plazmi za preprandijalno i postprandijalno stanje, koji su zasnovani na eksperimentalno dobijenim profilima brzine rastvaranja norfloksacina u “pojednostavljenim” fiziološki zasnovanim medijumima.



Slika 69. Predviđeni profili koncentracije norfloksacina u plazmi zasnovani na profilima brzine rastvaranja norfloksacina iz ispitivanih uzoraka u “pojednostavljenim” fiziološki zasnovanim medijumima i *in vivo* profil srednjih koncentracija norfloksacina u plazmi nakon oralne primene leka u preprandijalnim uslovima (557).

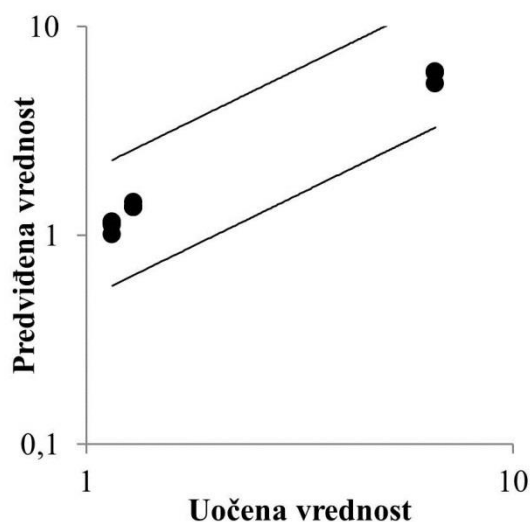
*In vitro* profili brzine rastvaranja norfloksacina u *FaSSIFs* sa NaLS nisu uključeni u simulaciju zbog interakcije norfloksacina sa NaLS. Naime, kao što je već pomenuto, Guo i saradnici (558) su dali direktan kristalografski dokaz da između norfloksacina i NaLS nastaje so  $[\text{NORH}^+][\text{LS}^-] \cdot 1,5 \text{ H}_2\text{O}$ , čijom površinom dominiraju hidrofobne metil grupe u NaLS što dovodi do povećane hidrofobnosti i smanjenja kvašenja u vodenom medijumu, što dalje za posledicu ima smanjenu rastvorljivost i brzinu rastvaranja lekovite supstance. Predviđeni profili za preprandijalno stanje su upoređeni sa *in vivo* uočenim profilom srednjih koncentracija norfloksacina u plazmi nakon oralne primene tablete od 400 mg u preprandijalnim uslovima, koji je takođe prikazan na Slici 69. U Tabeli 49 i na Slici 70 se uočava da su vrednosti svih farmakokinetičkih parametara koji su predviđeni na osnovu profila brzine rastvaranja norfloksacina u medijumima *FaSSIFb* i *FaSSIFs* sa 0,05% polisorbata 80 u opsegu dvostrukog odstupanja od srednje vrednosti *in vivo* dobijenih parametara. Dobijeni rezultati ukazuju da bi medijumi *FaSSIFb* i *FaSSIFs* sa polisorbata 80 mogli da se koriste kao biorelevantni za ispitivanje brzine rastvaranja norfloksacina iz konvencionalnih tableta u preprandijalnim uslovima.

Tabela 49. Prikaz vrednosti farmakokinetičkih parametara predviđenih na osnovu profila brzine rastvaranja norfloksacina iz ispitivanih uzoraka tableta u “pojednostavljenim” fiziološki zasnovanim medijuma koji simuliraju preprandijalne uslove i vrednosti uočene pri preprandijalnim uslovima *in vivo*

Medijum	Parametar	Preparat	predviđena vrednost ( <i>in silico</i> )	stvarna vrednost ( <i>in vivo</i> ) <sup>a</sup>	greška predviđanja
<i>FaSSIFb</i>	$C_{\max}$ (µg/ml)	N1	1,12	1,15	0,97
		N2	1,15		1,00
<i>FaSSIFs</i> sa 0,05% polisorbata 80		N1	1,01		0,88
		N2	1,16		1,01
<i>FaSSIFb</i>	$t_{\max}$ (h)	N1	1,44	1,29	1,12
		N2	1,36		1,05
<i>FaSSIFs</i> sa 0,05% polisorbata 80		N1	1,36		1,05
		N2	1,36		1,05
<i>FaSSIFb</i>	$\text{PIK}_{0-\infty}$ (µg h/ml)	N1	6	6,59	0,91
<i>FaSSIFs</i> sa 0,05% polisorbata 80		N2	6,05		0,92
		N1	5,33		0,81
		N2	6,07		0,92
<i>FaSSIFb</i>	Fa %	N1	70,11	75% <sup>b</sup>	/
<i>FaSSIFs</i> sa 0,05% polisorbata 80		N2	70,7		
		N1	62,28		
		N2	70,87		
<i>FaSSIFb</i>	F %	N1	41,1	30-40% <sup>c</sup>	/
<i>FaSSIFs</i> sa 0,05% polisorbata 80		N2	41,47		
		N1	36,53		
		N2	41,58		

<sup>a</sup>vrednost se odnosi na *in vivo* profil srednjih koncentracija norfloksacina u preprandijalnim uslovima preuzet iz ref.(557); <sup>b</sup>Vrednost preuzeta iz ref.(237); <sup>c</sup>Vrednost preuzeta iz ref. (553)





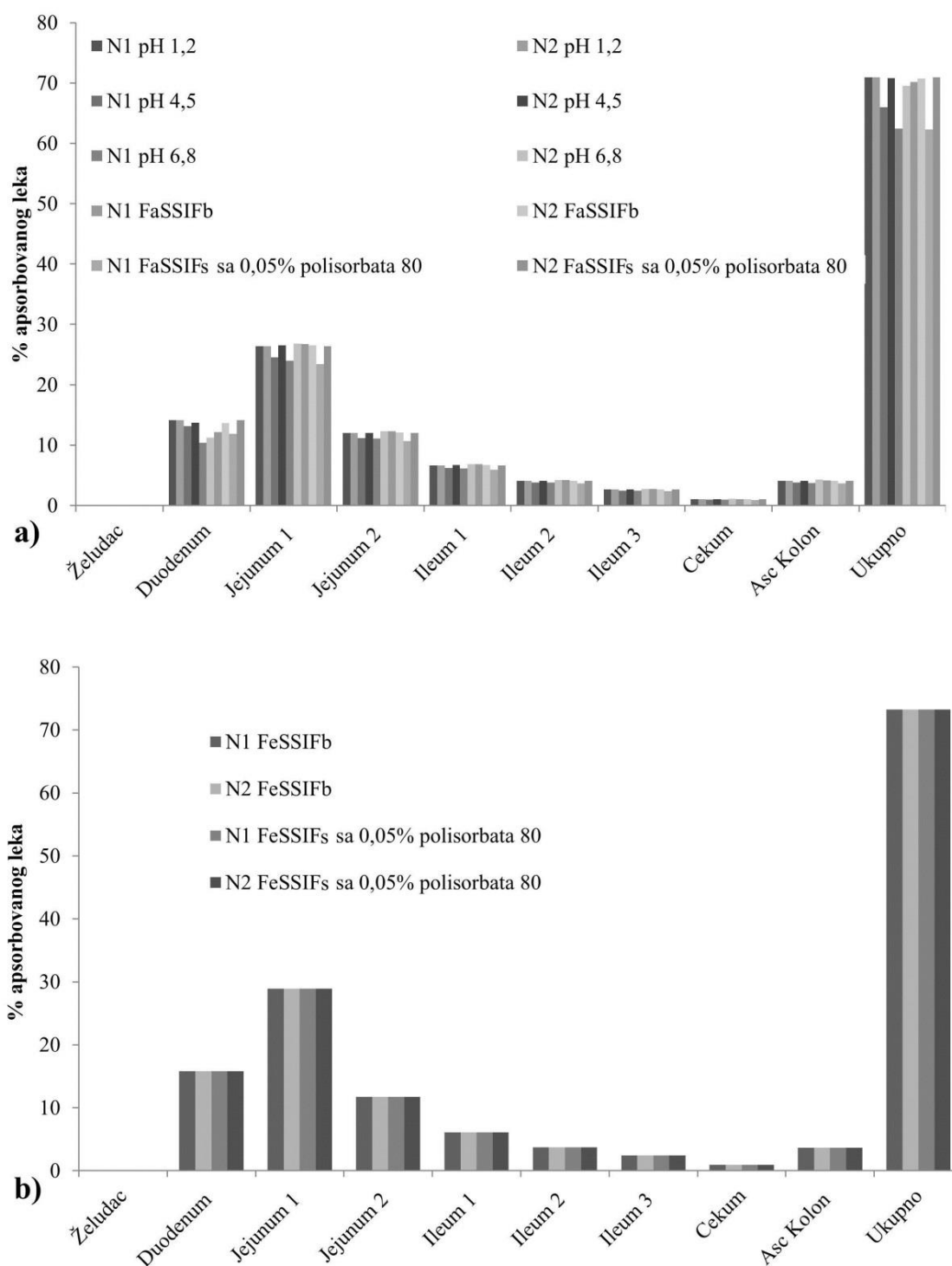
Slika 70. Poređenje vrednosti farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  i  $PIK_{0-\infty}$ ) predviđenih na osnovu profila brzine rastvaranja norfloksacina iz ispitivanih uzoraka tableta u “pojednostavljenim” fiziološki zasnovanim medijuma (*FaSSIFb*, *FaSSIFs* sa 0,05% polisorbata 80) i *in vivo* uočenih vrednosti ovih parametara nakon oralne primene norfloksacina u uslovima na gladno (Studija C)

Tabela 50. Prikaz vrednosti farmakokinetičkih parametara predviđenih na osnovu profila brzine rastvaranja norfloksacina iz ispitivanih uzoraka tableta u “pojednostavljenim” fiziološki zasnovanim medijumima koji simuliraju uslove u postprandijalnom stanju

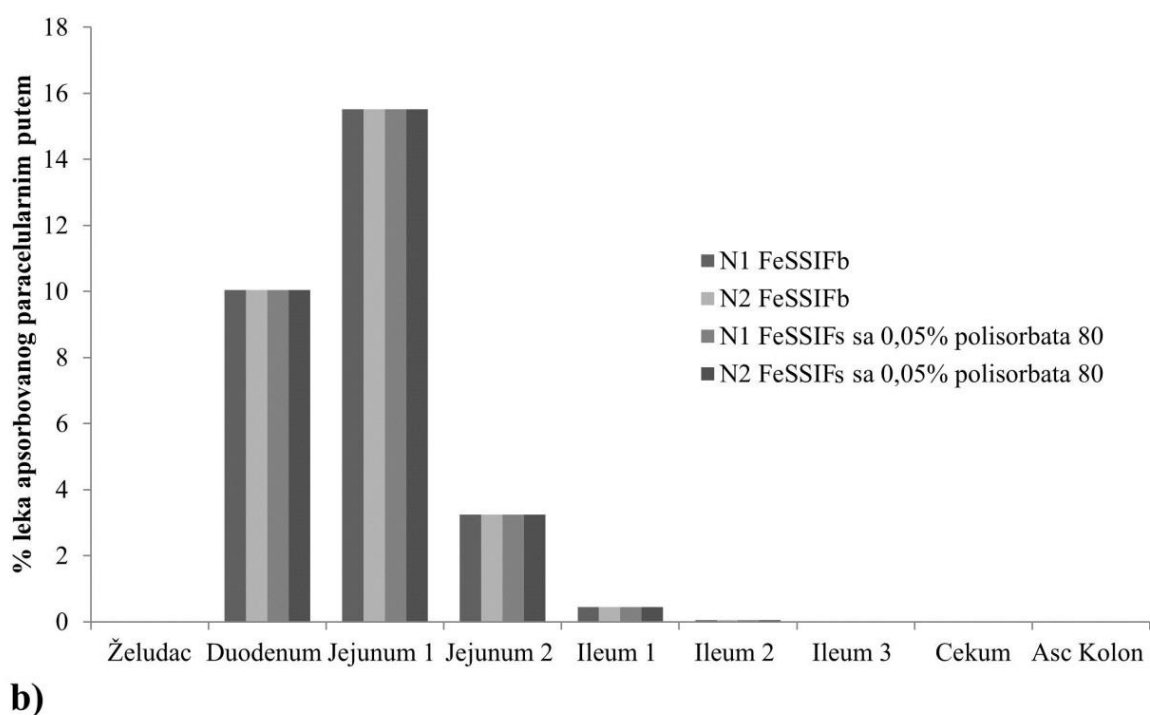
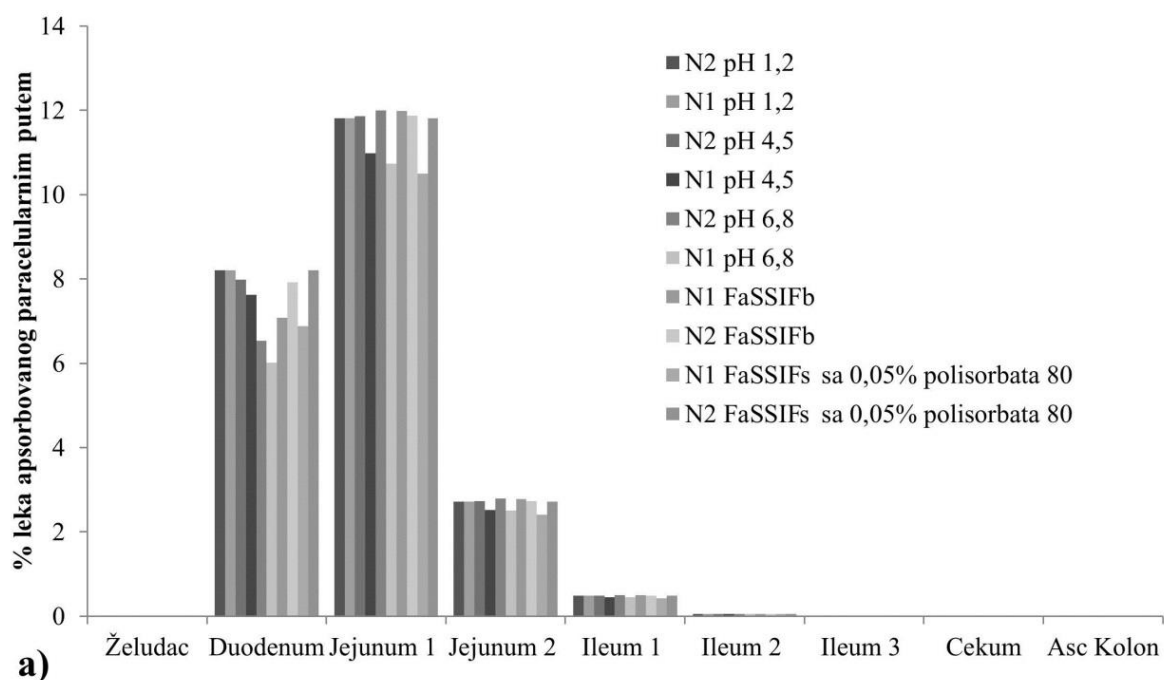
Medijum	Parametar	Preparat	predviđena vrednost ( <i>in silico</i> )
<i>FeSSIFb</i>	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	N1	0,96
<i>FeSSIFs</i> sa 0,1% polisorbata 80		N2	
<i>FeSSIFb</i>	$t_{max}$ (h)	N1	2
<i>FeSSIFs</i> sa 0,1% polisorbata 80		N2	2,04
<i>FeSSIFb</i>	$PIK_{0-\infty}$ ( $\mu\text{g h/ml}$ )	N1	6,25
<i>FeSSIFs</i> sa 0,1% polisorbata 80		N2	
<i>FeSSIFb</i>	Fa %	N1	73,21
<i>FeSSIFs</i> sa 0,1% polisorbata 80		N2	
<i>FeSSIFb</i>	F%	N1	43,03
<i>FeSSIFs</i> sa 0,1% polisorbata 80		N2	

Regionalni profil apsorpcije norfloksacina dobijen primenom PBPK modela pokazuje da se najveći procenat norfloksacina apsorbuje u duodenumu i jejunumu (Slika 71). U literaturi se objašnjava da, iako rastvorljivost većine fluorohinolona nije visoka pri pH vrednosti jejunuma, oni se dobro apsorbuju iz duodenuma i jejunuma (562). Rezultati simulacije takođe ukazuju na činjenicu da je

kod norfloksacina veći stepen apsorpcije u proksimalnom regionu GIT-a posledica izraženijeg paracelularnog transporta u ovom delu tankog creva (Slika 72).



Slika 71. Procenat apsorbovanog norfloksacina u različitim regionima GIT-a predviđen na osnovu profila brzine rastvaranja norfloksacina iz ispitivanih uzoraka tableta u medijumima koji simuliraju uslove primene leka na gladno (a), odnosno nakon obroka (b)



Slika 72. Procenat norfloksacina apsorbovanog paracelularnim putem u različitim regionima GIT-a predviđen na osnovu profila brzine rastvaranja norfloksacina iz ispitivanih uzoraka tableta u medijumima koji simuliraju uslove primene leka na gladno (a), odnosno nakon obroka (b)

*In silico* predviđeni profili koncentracije norfloksacina u plazmi za postprandijalno stanje, koji su zasnovani na profilima brzine rastvaranja norfloksacina u “praznom” *FeSSIF* i *FeSSIFs* sa 0,1% polisorbata 80 se međusobno podudaraju (Slika 69 i Tabela 50) što je očekivano s obzirom na to da je oslobađanje lekovite supstance iz obe formulacije u ovim medijumima bilo veoma brzo i potpuno. Na dobijenim profilima se uočava smanjenje  $C_{max}$  i značajno produženje  $t_{max}$  u odnosu na simulirane profile za preprandijalno stanje, ali ove razlike nisu dovele do značajne promene u  $PIK_{0-\infty}$  ni za jedan od dobijenih profila koncentracije leka u plazmi (Tabela 51). Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima drugih *in vivo* studija u kojima je pokazano da istovremeno uzimanje fluorohinolona sa standardnim doručkom sa visokim udelom masti dovodi do povećanja  $t_{max}$  i smanjenja  $C_{max}$  zbog produženog vremena zadržavanja u želucu, ali ne i do značajne promene u bioraspoloživosti ovih lekovitih supstanci (554, 563, 564).

Tabela 51. Uticaj hrane na apsorpciju norfloksacina – odnos vrednosti osnovnih farmakokinetičkih parametara u uslovima primene nakon obroka i primene na gladno

Uslovi ispitivanja	Odnos vrednosti parametra postprandijalno/preprandijalno		
	$C_{max}$	$t_{max}$	$PIK_{0-\infty}$
<i>FeSSIFb</i> / <i>FaSSIFb</i>	0,86 (N1)	1,39 (N1)	1,04 (N1)
	0,83 (N2)	1,50 (N2)	1,03 (N2)
<i>FeSSIFs</i> / <i>FaSSIFs</i> sa dodatkom polisorbata 80	0,95 (N1)	1,47 (N1)	1,17 (N1)
	0,83 (N2)	1,50 (N2)	1,03 (N2)

Rezultati *in vitro* ispitivanja su pokazali da na brzinu rastvaranja norfloksacina iz ispitivanih preparata u medijumima pH 6,8 i *FaSSIFb* (pH 6,5) značajno utiče sastav formulacije tj. brzina rastvaranja norfloksacina je, u slučaju oba pomenuta medijuma, bila značajno veća iz uzorka N2. Iako su rezultati *in vitro* ispitivanja pokazali da brzina rastvaranja norfloksacina iz ispitivanih preparata opada sa porastom pH vrednosti, prema rezultatima simulacije kod norfloksacina je stepen apsorpcije veći u proksimalnom regionu GIT-a što je posledica izraženijeg paracelularnog transporta u ovom delu tankog creva. Prema rezultatima *in silico* simulacije primena norfloksacina sa standardnim obrokom ne bi trebala da dovede do značajne promene u njegovoj apsorpciji što je u skladu sa rezultatima *in vivo* studija.

#### 5.4.5. Uporedna analiza rezultata biofarmaceutske karakterizacije ispitivanih model supstanci

U okviru ovog poglavlja sagledane su uporedo najvažnije biofarmaceutske karakteristike ispitivanih model supstanci i rezultati sprovedenih istraživanja.

##### *Fizičko-hemijske i biofarmaceutske karakteristike ispitivanih model supstanci*

U tabeli 52 prikazane su uporedo vrednosti osnovnih fizičko-hemijskih i biofarmaceutskih parametara ispitivanih model supstanci (aciclovir, furosemid, valsartan i norfloksacin). Odgovarajući podaci su preuzeti iz literature, eksperimentalno određeni, odnosno predviđeni primenom modela napredne analize podataka i fiziološki zasnovane farmakokinetičke analize sprovedene u okviru ovog istraživanja. Na Slici 73 prikazani su uporedo podaci o stepenu regionalne apsorpcije ispitivanih model supstanci u uslovima primene leka na gladno i nakon obroka dobijeni *in silico* primenom razvijenih fiziološki zasnovanih farmakokinetičkih modela.

Kao što se može videti iz uporednog pregleda (Tabela 52), sve četiri ispitivane model supstance imaju molekulska masa manju od 500 Da, clogP vrednosti manje od 5 i HB vrednosti manje od 15 što ukazuje da se u skladu sa "pravilom petice" (Lipinski i saradnici (20)) mogu smatrati supstancama kod kojih se potencijalno može očekivati dobra apsorpcija.

Sve četiri model supstance su kiseline, koje imaju pKa vrednosti u fiziološkom rasponu pH i pH zavisnu rastvorljivost. Prema BCS kriterijumima, koji uzimaju u obzir minimalnu rastvorljivost lekovite supstance u opsegu pH vrednosti 1,0-6,8, sve četiri lekovite supstance su nisko rastvorljive. Međutim, D/S vrednosti valsartana i furosemida su na pH 6,8 bile značajno niže od 250 što bi trebalo imati u vidu prilikom klasifikacije slabo rastvorljivih jedinjenja tipa kiselina kao što su predložili Tsume i saradnici (167).

Prema eksperimentalno određenim logP vrednostima dostupnim u literaturi ispitivane model supstance, izuzev furosemida, se mogu okarakterisati kao izrazito hidrofilne. Prema  $P_{eff}$  vrednostima predviđenim pomoću *in silico* ANN modela razvijenog u okviru ovog istraživanja aciclovir i furosemid su grupisani sa nisko permeabilnim lekovitim supstancama ( $P_{eff} < 1 \times 10^{-4}$  cm/s), dok su norfloksacin i valsartan grupisani sa srednje permeabilnim lekovitim supstancama ( $P_{eff}$  vrednosti od  $1,15 \times 10^{-4}$  do  $2,61 \times 10^{-4}$  cm/s).

Kao što se može videti na Slici 74, primenom PBPK modela pokazano da je ukupna količina apsorbovanog leka najveća u slučaju norfloksacina. Kod aciclovira, furosemida i valsartana frakcija apsorbovanog leka i bioraspoloživost su bile slične i u skladu sa literaturnim podacima. Kod norfloksacina su frakcija apsorbovanog leka i bioraspoloživost takođe bile u skladu sa literaturnim podacima pri čemu je bioraspoloživost bila značajno niža zbog, kao što je već diskutovano, izraženog efekta prvog prolaza.

Najveći stepen apsorpcije se za sve četiri supstance uočava u jejunumu 1, mada apsorpcija započinje već u duodenumu (Slika 73). Za razliku od aciclovira i valsartana, koji se uopšte ne apsorbuju iz distalnih delova GIT-a, furosemid i norfloksacin se apsorbuju duž celog GIT-a.

U uslovima primene leka nakon obroka ne dolazi do značajnijih promena u obimu regionalne apsorpcije aciclovira, furosemide i norfloksacina, dok se u slučaju valsartana stepen apsorpcije u duodenumu i jejunumu 1 povećava (Slika 73). Dakle, kao što je već rečeno, rezultati simulacije su pokazali da prisustvo hrane ne utiče na apsorpciju aciclovira, furosemide i norfloksacina, dok u slučaju valsartana dolazi do povećanja obima apsorpcije u prisustvu hrane (Tabela 52).

Tabela 52. Fizičko-hemijske i biofarmaceutske karakteristike ispitivanih model supstanci

Parametar	Aciklovir	Furosemid	Valsartan	Norfloksacin
Molekulska masa (g/mol)	225,2	330,8	435,5	319,3
TPSA	114,8	131	112,1	72,9
HB	11	10	10	9
pKa	2,27 (kiselina) 9,25 (baza) <sup>(501)</sup>	3,88 (kiselina) <sup>(84)</sup>	3,9 (kiselina) <sup>(527)</sup>	6,23 (kiselina) 8,51 (baza) <sup>(546)</sup>
Doza (mg)	200 – 800	40 – 80	40 – 320	200 - 400
Minimalna rastvorljivost u opsegu pH vrednosti 1-6,8 (mg/ml)	2,35 <sup>(303)</sup>	0,012 <sup>(273)</sup>	0,1 <sup>(330)</sup>	0,75 <sup>(392)</sup>
Rastvorljivost pri pH 6,8 (mg/ml)	2,5 <sup>(303)</sup>	3,61 <sup>(84)</sup>	11,32 <sup>(256)</sup>	0,94 <sup>(547)</sup>
D/S ( u skladu sa BCS)	340	3333,33	1600	533
D/S (pH 6,8)	320	22,2	28,3	425
clogP	-2,42	1,90	4,86	-0,78
Eksperimentalne log P/logD vrednosti	-1,8 <sup>(45, 169)</sup>	2,56 <sup>(517)</sup>	-0,34 (pH 7,0) <sup>(540)</sup>	-0,43 <sup>(548)</sup>
Permeabilnost, P <sub>eff</sub> (x 10 <sup>-4</sup> cm/s) <sup>a</sup>	0,90	0,2	1,6	2,0
Frakcija apsorbovanog leka, Fa (%)	10-30 <sup>(501)</sup>	61 <sup>(237)</sup>	55 <sup>(237)</sup>	75 <sup>(237)</sup>
Fa (%), predviđeno pomoću PBPK modela	10,2	54,8	23,2	71,6
Biološka raspoloživost F (%)	10-30 <sup>(501)</sup>	27,2 -80,5 <sup>(519)</sup>	23-39 <sup>(527)</sup>	30-40 <sup>(553)</sup>
F (%), predviđeno pomoću PBPK modela	10,2	53,8	23,2	42,0
Uticaj hrane (FE)	FE0 <sup>(510)</sup>	FE↓ <sup>(519)</sup>	FE↓ <sup>(530)/FE0<sup>(533)</sup></sup>	FE↓ <sup>(554)/FE0<sup>(563, 564)</sup></sup>
FE predviđen pomoću RF modela	FE↓	FE↓	FE↓	FE↓
FE predviđen pomoću PBPK modela	FE0	FE0	FE↑	FE0

<sup>a</sup> vrednosti predviđene pomoću ANN modela razvijenog u okviru ovog istraživanja

U Tabeli 53 je dat prikaz brzine rastvaranja ispitivanih model supstanci iz tableta. Ispitivanje brzine rastvaranja aciklovira iz tableta je pokazalo da je oslobađanje aciklovira bilo veoma brzo i potpuno u svim ispitivanim medijumima. U slučaju furosevida je nakon 30 minuta oslobođeno više od 85% lekovite supstance u svim ispitivanim medijumima izuzev medijuma pH 1,2. Prema rezultatima *in vitro* ispitivanja rastvaranja valsartana nije bilo potpuno samo u medijumima pH 1,2 i 4,5. Rastvaranje norfloksacina iz ispitivanih preparata je bilo brzo i potpuno u svim ispitivanim medijumima izuzev medijuma pH 6,8 i medijuma sa NaLS. Dobijeni rezultati brzine rastvaranja ispitivanih lekovitih supstanci iz tableta su u skladu sa literaturnim podacima za njihovu

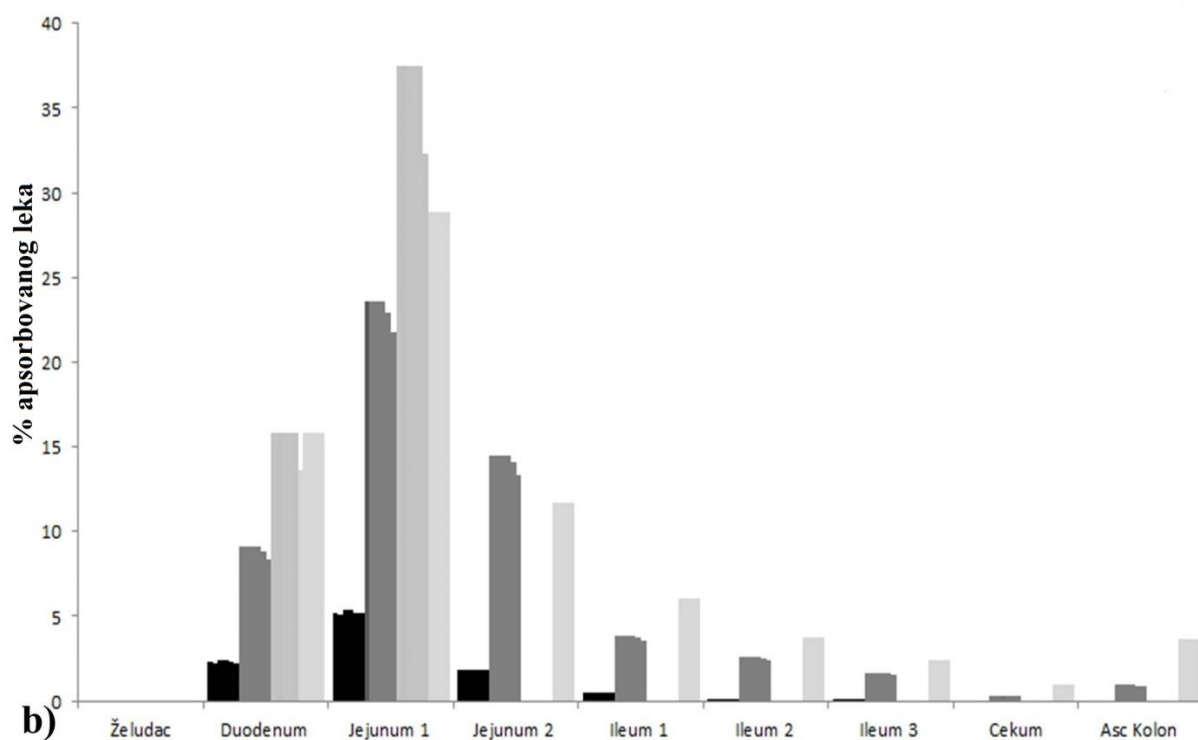
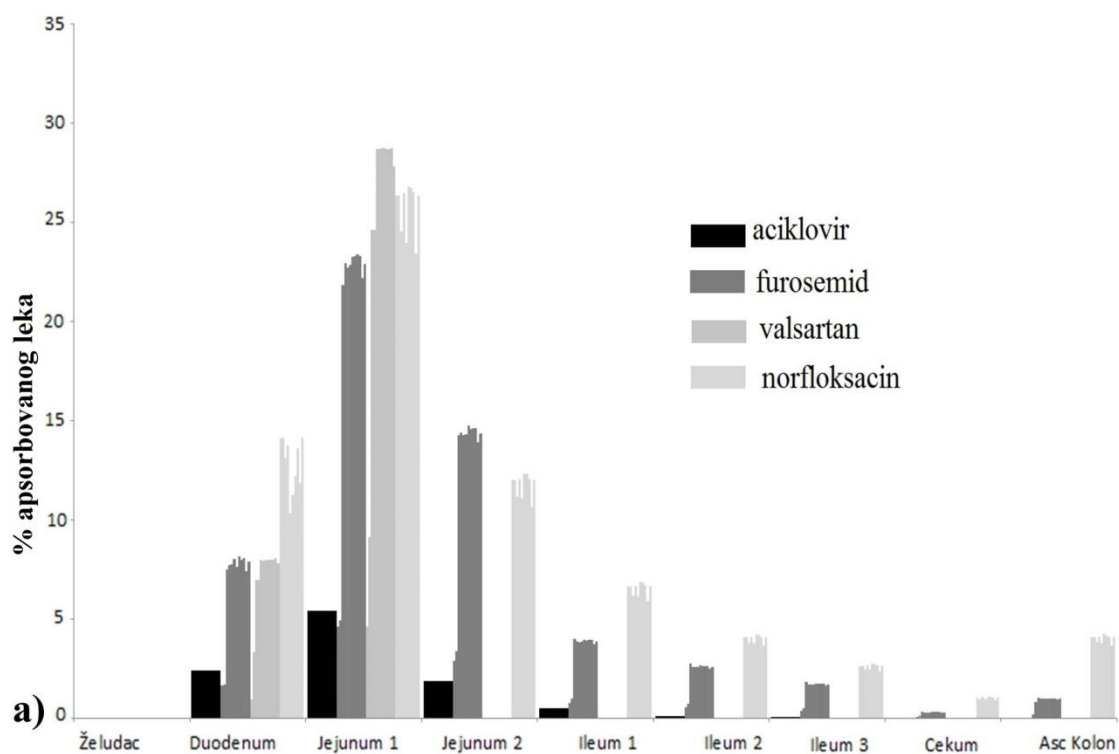
rastvorljivost. Aciklovir, furosemid i valsartan se pri pH vrednostima, koje odgovaraju proksimalnom tankom crevu, ponašaju kao visoko rastvorljive lekovite supstance što potvrđuje i njihovo potupno rastvaranje u *FaSSIFb* pH 6,5 i *FeSSIFb* pH 5. Rastvorljivost norfloksacina dramatično opada iznad pH 5,8 o čemu svedoči i činjenica da u medijumu pH 6,8 nije postignuto potpuno rastvaranje za 30 minuta, dok je u *FaSSIF* pH 6,5 postignuto potpuno rastvaranje.

Tabela 53. Brzina rastvaranja ispitivanih model supstanci iz tableta,  $Q_{30min}$  (%)

Medijum	Aciklovir	Furosemid	Valsartan	Norfloksacin
pH 1,2	> 85	< 25	< 35	> 85
pH 4,5	> 85	> 85	70-80	> 85
pH 6,8	> 85	> 85	> 85	70-80
<i>FaSSIFb</i>	> 85	> 85	> 85	> 85
<i>FaSSIFs</i> sa 0,05% NaLS	> 85	> 85	> 85	< 30
<i>FaSSIFs</i> sa 0,05% polisorbata 80	> 85	> 85	> 85	> 85
<i>FeSSIFb</i>	> 85	> 85	> 85	> 85
<i>FeSSIFs</i> sa 0,1% NaLS	> 85	> 85	> 85	< 65
<i>FeSSIFs</i> sa 0,1% polisorbata 80	> 85	> 85	80	> 85

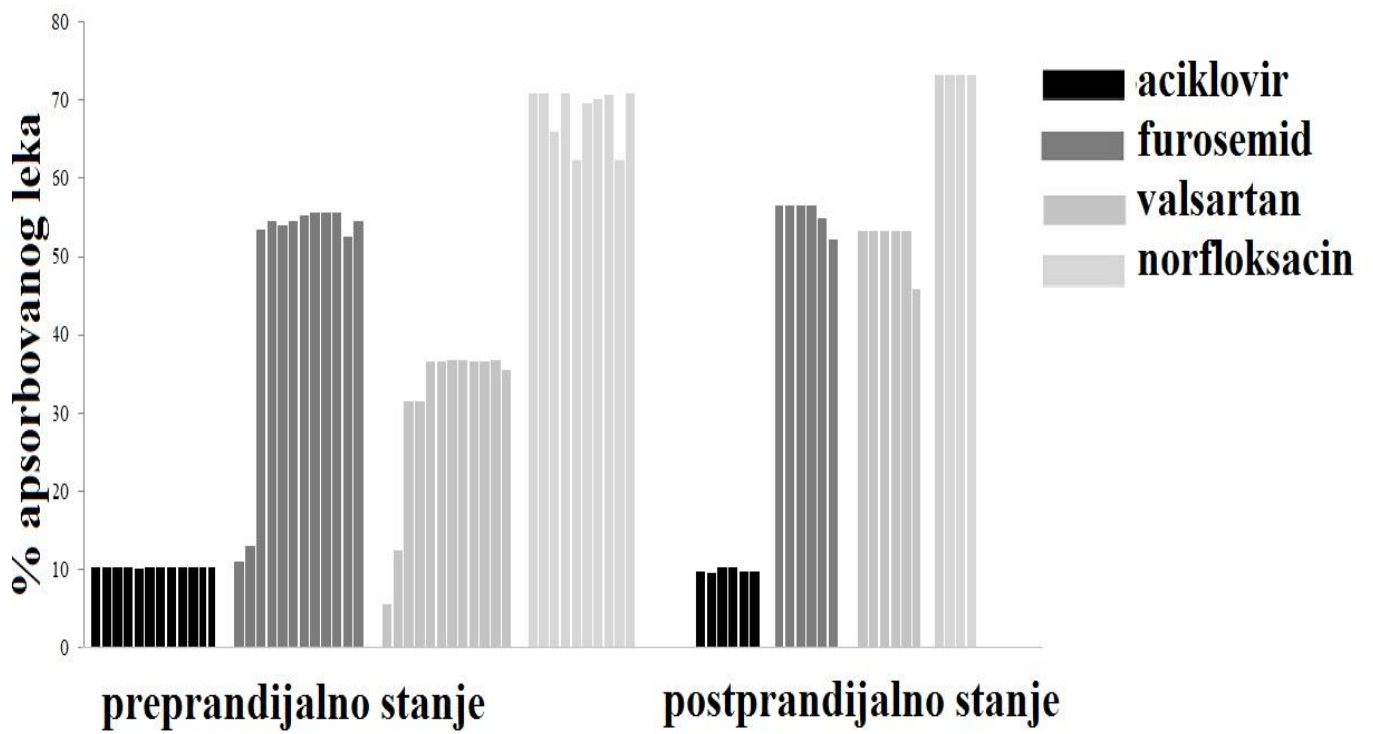
Na osnovu uporedne analize rezultata biofarmaceutske karakterizacije izabranih model supstanci koje su u literaturi opisane kao nisko rastvorljive i nisko permeabilne, uočava se da su sve četiri ispitivane lekovite supstance tipa slabih kiselina, koje pokazuju ograničenu rastvorljivost pri niskim vrednostima pH kakve postoje u želucu, na osnovu kojih su, u skladu sa kriterijumima Biofarmaceutskog sistema klasifikacije okarakterisane kao „nisko rastvorljive“. Međutim, njihova rastvorljivost se sa porastom pH vrednosti povećava i ukazuje na mogućnost potpunog rastvaranja primenjene doze pri uslovima koji postoje u tankom crevu. Ovo je dodatno potvrđeno uporednim ispitivanjem brzine rastvaranja lekovite supstance u različitim medijumima u okviru kojih je u svim medijumima (osim 0,1 M HCl i medijuma koji sadrži natrijum-laurilsulfat i pokazuje interakciju sa norfloksacinom) uočeno brzo rastvaranje lekovite supstance (više od 80, odnosno 85% rastvoreno nakon 30 minuta).

Sve četiri ispitivane model supstance su komercijalno dostupne u obliku konvencionalnih neobloženih ili film tableta izrađenih uz primenu uobičajenih ekscipijenasa i bez dodatka pomoćnih supstanci koji olakšavaju kvašenje i rastvaranje lekovite supstance, što dodatno ukazuje na njihovu zadovoljavajuću rastvorljivost u gastrointestinalnom traktu. Primenom modela napredne analize podataka (RF model, algoritam slučajnih šuma) razvijenog u okviru ovog istraživanja, na osnovu podataka o odnosu doza/rastvorljivost ( $D/S$ ), efektivnoj permeabilnosti ( $P_{eff}$ ), obimu metabolizma ( $F_m$ ) i poluvremenu eliminacije ( $t_{1/2}$ ) predviđen negativan uticaj hrane, odnosno smanjen obim i brzina apsorpcije lekovite supstance u uslovima primene uz obrok. Međutim, rezultati *in silico* simulacija primenom razvijenog PBPK modela ukazuju na odsustvo efekta hrane, osim u slučaju valsartana. Ovakvi rezultati su u skladu i sa donekle kontradiktornim rezultatima *in vivo* studija, s obzirom da je u slučaju valsartana i norfloksacina u nekim studijama zabeleženo odsustvo, a u nekim negativan uticaj hrane. Dobijeni rezultati ukazuju na složene i međusobno povezane faktore koji utiču na apsorpciju leka u uslovima primene nakon obroka, kao i preveliku diskriminatornost razvijenog RF modela.



Slika 73. Uporedni prikaz regionalne apsorpcije ispitivanih model supstanci u GIT-u predviđen na osnovu profila brzine rastvaranja lekovite supstance iz ispitivanih uzoraka tableta u medijumima koji simuliraju uslove primene leka na a) gladno i b) nakon obroka





Slika 74. Uporedni prikaz ukupne apsorpcije ispitivanih model supstanci u GIT-u predviđen na osnovu profila brzine rastvaranja lekovite supstance iz ispitivanih uzoraka tableta u medijumima koji simuliraju uslove primene leka na gladno i nakon obroka



## 6. ZAKLJUČCI

Mogućnost primene različitih tehnika za naprednu analizu podataka ispitana je na uzorku od 128 model lekovitih supstanci koje su grupisane u tri seta podataka na osnovu opsežne analize dostupnih informacija o njihovim fizičko-hemijskim, biofarmaceutskim i farmakokinetičkim karakteristikama. Set podataka A sadržao je 75 lekovitih supstanci za koje je efektivna permeabilnost određena u okviru *in vivo* studija intestinalne perfuzije kod ljudi ili su njihova biofarmaceutska svojstva detaljno opisana u okviru FIP Biowaiver monografija; set podataka B sadržao je 27 lekovitih supstanci za koje je u okviru *in vivo* studija pokazana biološka ekvivalentnost između oralno primenjenog rastvora i čvrstog farmaceutskog oblika, uz pretpostavku da farmaceutski oblik leka ne utiče značajno na njegovu apsorpciju, dok je set podataka C obuhvatao 26 lekovitih supstanci za koje se u literaturi navodi da pokazuju nisku rastvorljivost i nisku permeabilnost.

Tehnika nerekurzivnih neuronskih mreža treniranih algoritmom povratne propagacije, višeslojni perceptroni, je uspešno primenjena za razvoj modela za predviđanje intestinalne permeabilnosti lekovitih supstanci u ljudi na osnovu izabranih molekularskih deskriptora. Model je validiran na osnovu podataka o lekovitim supstancama koje su raspoređene u test, odnosno eksterni set podataka i može se koristiti za predviđanje permeabilnosti lekovitih supstanci čije se vrednosti analiziranih deskriptora (TPSA, HBD i HB) nalaze u sledećem opsegu:  $[37,3-163] \pm 37,71$  za TPSA,  $[0-5] \pm 1,5$  za HBD i  $[2-11] \pm 2,7$  za HB.

Primenom tehnika hijerarhijskog klasterovanja na glavnim komponentama i stabla odlučivanja na setu podataka od 64 lekovite supstance sa različitim fizičko-hemijskim i biofarmaceutskim osobinama, intestinalna permeabilnost ( $P_{\text{eff}}$ ) je identifikovana kao kritičan parametar koji utiče na apsorpciju lekovitih supstanci. Iako je rastvorljivost, u vidu odnosa doza/rastvorljivost (parametar D/S), bila jedna od ulaznih varijabli za klaster analizu, algoritam nijednom nije identifikovao ovaj parametar kao značajan za proces klasterovanja lekovitih supstanci. Pored „nisko” permeabilnih ( $P_{\text{eff}} < 1 \times 10^{-4}$  cm/s) i „visoko” permeabilnih ( $P_{\text{eff}} > 2,7 \times 10^{-4}$  cm/s) lekovitih supstanci prepoznata je i grupa „srednje” permeabilnih lekovitih supstanci, čije  $P_{\text{eff}}$  vrednosti variraju od 1 do  $2,7 \times 10^{-4}$  cm/s. Takođe je uočeno da su nisko permeabilne supstance generalno okarakterisane vrednostima frakcije apsorbovanog leka ( $F_a$ ) manjim od 50%, dok su supstance sa umerenom permeabilnošću okarakterisane  $F_a$  vrednostima u rasponu od 50 do 84%, a visoko permeabilne supstance vrednostima  $F_a$  većim od 85%. Ovakvi rezultati ukazuju na postojanje „ternernog” sistema klasifikacije, što je u skladu sa rezultatima drugih autora koji ističu značaj uvođenja “srednje” klase za permeabilnost lekovitih supstanci u cilju boljeg predviđanja njihove apsorpcije.

Rezultati sprovedenih analiza pokazuju da visoke  $P_{\text{eff}}$  vrednosti mogu kompenzovati nisku rastvorljivost lekovite supstance tj. da se visoko permeabilne lekovite supstance mogu uspešno apsorbovati iz gastrointestinalnog trakta bez obzira na rastvorljivost određenu *in vitro*. Klaster analize sprovedene na setu od 27 lekovitih supstanci, za koje je u okviru *in vivo* studija pokazana biološka ekvivalentnost između oralno primenjenog rastvora i čvrstog farmaceutskog oblika (set podataka B) i setu sa 26 lekovitih supstanci za koje se u literaturi navodi da pokazuju nisku rastvorljivost i nisku permeabilnost (set podataka C), a potom i na zbirnom setu podataka B i C, su pokazale da je većina lekovitih supstanci grupisana u dve klase, čije su granice definisane  $P_{\text{eff}}$  vrednostima od približno  $2 \times 10^{-4}$  cm/s i  $F_a$  i  $F_m$  vrednostima od 85% i 50%, redom. Takođe, klaster analize na setu podataka B i zbirnom setu podataka su ukazale i na vezu između  $F_m$  i  $\text{clogP}$  tj. lipofilnije lekovite supstance su imale i veći obim metabolizma. Uočeno je i da je većina lekovitih supstanci sa TPSA vrednostima manjim od 70 imala visoke  $F_a$  vrednosti. Na ovaj način je potvrđeno da je *in vivo* ponašanje lekovitih supstanci usko povezano sa njihovom hemijskom strukturom i fizičko-hemijskim osobinama.

Pomoću algoritma slučajnih šuma i algoritma potpornih vektora sa polinomialnom kernel funkcijom su razvijena dva klasifikaciona modela za predviđanje efekta hrane na apsorpciju lekovitih supstanci na osnovu odnosa doza/rastvorljivost (D/S), efektivne permeabilnosti ( $P_{\text{eff}}$ ), obima

metabolizma ( $F_m$ ) i poluvremena eliminacije ( $t_{1/2}$ ). Oba modela su relativno uspešno predvideli efekat hrane za test set, ali je samo RF model zadržao izvestan, prihvatljiv stepen predikcije kada su modeli testirani na nepoznatom, eksternom setu lekovitih supstanci ( $\kappa$  vrednost  $> 0,4$ ). Dobijeni rezultati ukazuju na to da se efekat hrane verovatno neće ispoljiti kod lekovitih supstanci koje se obimno metabolišu, imaju nizak odnos doza/rastvorljivost, te kratko poluvreme eliminacije i visoku permeabilnost. Lekovite supstance sa niskim ili visokim doza/rastvorljivost odnosom, koje se slabo metabolišu i imaju nisku permeabilnost i kratko poluvreme eliminacije, su, pomoću oba modela, klasifikovane u klasu  $FE\downarrow$  (što ukazuje na postojanje negativnog efekta hrane, odnosno smanjenog obima i brzine apsorpcije u uslovima primene uz obrok). Lekovite supstance koje su svrstane u klasu  $FE\uparrow$  (što ukazuje na postojanje pozitivnog efekta hrane, odnosno povećanog obima apsorpcije u uslovima primene uz obrok) su imale visok odnos doza/rastvorljivost, visoku permeabilnost i visok stepen metabolizma. Dakle, RF model je moguće primeniti da bi se predvidelo da li se na osnovu pomenutih karakteristika kao ulaznih parametara za neku lekovitu supstancu može očekivati da će prisustvo hrane imati efekta na njenu apsorpciju u GIT-u i da li će taj efekat biti pozitivan ili negativan.

Četiri model lekovite supstance za koje se u literaturi navodi da pokazuju nisku rastvorljivost i nisku permeabilnost (aciklovir, furosemid, valsartan i norfloksacin) su detaljno okarakterisane primenom fiziološki zasnovanih farmakokinetičkih modela u kombinaciji sa rezultatima *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja aktivne supstance u različitim medijumima. Eksperimentalno je ispitan uticaj medijumima različitih pH vrednosti (pH 1,2; pH 4,5; pH 6,8) i, takozvanih, pojednostavljenih fiziološki zasnovanih medijuma (bez surfaktanata i uz dodatak sintetskih površinski aktivnih supstanci) koji simuliraju uslove u gastrointestinalnom traktu u uslovima primene leka na gladno, odnosno nakon obroka (preprandijalni i postprandijalni uslovi). Iako se radi o model supstancama koje su opisane kao nisko rastvorljive, rezultati sprovedenih *in vitro* ispitivanja su pokazali da je u svim ispitivanim medijumima, osim u medijumu pH 1,2, bez i uz dodatak sintetskih površinski aktivnih supstanci, postignuto brzo rastvaranje lekovitih supstanci (više od 80, odnosno 85% rastvoreno nakon 30 minuta). Jedino odstupanje uočeno je u slučaju norfloksacina usled postojanja interakcije sa natrijum-laurilsulfatom koja je poznata i opisana u literaturi.

Uporedna analiza rezultata biofarmaceutske karakterizacije izabranih model supstanci koje su u literaturi opisane kao nisko rastvorljive i nisko permeabilne, pokazala je da su sve četiri ispitivane lekovite supstance tipa slabih kiselina, koje pokazuju ograničenu rastvorljivost pri niskim vrednostima pH kakve postoje u želucu, na osnovu kojih su, u skladu sa kriterijumima Biofarmaceutskog sistema klasifikacije okarakterisane kao „nisko rastvorljive“. Međutim, njihova rastvorljivost se sa porastom pH vrednosti povećava i ukazuje na mogućnost potpunog rastvaranja primenjene doze pri uslovima koji postoje u tankom crevu. Sve četiri ispitivane model supstance su komercijalno dostupne u obliku konvencionalnih neobloženih ili film tableta izrađenih uz primenu uobičajenih ekscipijenasa i bez dodatka pomoćnih supstanci koji olakšavaju kvašenje i rastvaranje, i u uslovima *in vitro* ispitivanja pokazuju brzo i kompletno rastvaranje aktivne supstance u svim medijumima pH vrednosti veće od 4,5.

Primenom unapređenog prostornog modela apsorpcije i tranzita (programski paket GastroPlus<sup>TM</sup>, Simulations Plus, SAD) razvijeni su i validirani fiziološki zasnovani farmakokinetički modeli za predviđanje *in vivo* ponašanja za svaku od četiri izabrane model supstance. Razvijeni modeli su zatim uspešno primenjeni za predviđanje profila koncentracije ispitivanih lekovitih supstanci u plazmi u preprandijalnim i postprandijalnim uslovima na osnovu profila brzine rastvaranja iz komercijalno dostupnih uzoraka tableta sa trenutnim oslobađanjem u različitim medijumima.

Za razliku od modela napredne analize podataka (RF model, algoritam slučajnih šuma) razvijenog u okviru ovog istraživanja, rezultati *in silico* simulacija primenom razvijenog PBPK modela ukazali su na odsustvo efekta hrane, osim u slučaju valsartana. Ovakvi rezultati su u skladu i sa donekle kontradiktornim rezultatima *in vivo* studija, s obzirom da je u slučaju valsartana i norfloksacina u

nekim studijama uočeno odsustvo, a u nekim negativan uticaj hrane. Dobijeni rezultati ukazuju na složene i međusobno povezane faktore koji utiču na apsorpciju leka u uslovima primene nakon obroka, kao i preveliku diskriminatornost razvijenog RF modela.

Rezultati biofarmaceutske karakterizacije izabranih model supstanci za koje se u literaturi navodi da pokazuju nisku rastvorljivost i nisku permeabilnost ukazuju na to da su postojeći kriterijumi na kojima se zasniva procena rastvorljivosti u okviru Biofarmaceutskog sistema klasifikacije previše strogi i da ih je potrebno modifikovati kako bi se uspostavile biorelevantne granične vrednosti i kriterijumi za klasifikaciju lekova na osnovu rastvorljivosti, naročito kada se radi o lekovitim supstancama tipa slabih kiselina. U skladu sa navedenim, kao i rezultatima napredne analize podataka, kao kritičan parametar za biofarmaceutsku klasifikaciju supstanci izdvaja se permeabilnost definisana u vidu termerne klasifikacije na visoko, umereno i nisko permeabilne lekovite supstance.



## 7. LITERATURA

1. Butler J, Hens B, Vertzoni M, Brouwers J, Berben P, Dressman J, et al. In vitro models for the prediction of in vivo performance of oral dosage forms: Recent progress from partnership through the IMI OrBiTo collaboration. *Eur J Pharm Biopharm.* 2019;136:70-83.
2. Dahlgren D, Lennernäs H. Intestinal Permeability and Drug Absorption: Predictive Experimental, Computational and In Vivo Approaches. *Pharmaceutics.* 2019;11(8):411.
3. Vertzoni M, Augustijns P, Grimm M, Koziolok M, Lemmens G, Parrott N, et al. Impact of regional differences along the gastrointestinal tract of healthy adults on oral drug absorption: An UNGAP review. *Eur J Pharm Sci.* 2019;134:153-75.
4. Martinez MN, Amidon GL. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. *J Clin Pharmacol.* 2002;42(6):620-43.
5. Lennernäs HJ. Regional intestinal drug permeation: biopharmaceutics and drug development. *Eur J Pharm Sci.* 2014;57:333-41.
6. Thomas VH, Bhattachar S, Hitchingham L, Zocharski P, Naath M, Surendran N, et al. The road map to oral bioavailability: an industrial perspective. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2006;2(4):591-608.
7. Karlsson J, Ungell A-L, Gråsjö J, Artursson P. Paracellular drug transport across intestinal epithelia: influence of charge and induced water flux. *Eur J Pharm Sci.* 1999;9(1):47-56.
8. Ungell A-L, Nylander S, Bergstrand S, Sjöberg Å, Lennernäs H. Membrane transport of drugs in different regions of the intestinal tract of the rat. *J Pharm Sci.* 1998;87(3):360-6.
9. Hurst S, Loi C-M, Brodfuehrer J, El-Kattan A. Impact of physiological, physicochemical and biopharmaceutical factors in absorption and metabolism mechanisms on the drug oral bioavailability of rats and humans. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2007;3(4):469-89.
10. Benet LZ, Hosey CM, Ursu O, Oprea TI. BDDCS, the rule of 5 and drugability. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;101:89-98.
11. Sugano K, Kansy M, Artursson P, Avdeef A, Bendels S, Di L, et al. Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(8):597.
12. Smith D, Artursson P, Avdeef A, Di L, Ecker GF, Faller B, et al. Passive lipoidal diffusion and carrier-mediated cell uptake are both important mechanisms of membrane permeation in drug disposition. *Mol Pharm.* 2014;11(6):1727-38.
13. Di L, Artursson P, Avdeef A, Ecker GF, Faller B, Fischer H, et al. Evidence-based approach to assess passive diffusion and carrier-mediated drug transport. *Drug Discov Today.* 2012;17(15-16):905-12.
14. Lipinski CA. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2000;44(1):235-49.
15. Wang J, Hou T. Recent advances on aqueous solubility prediction. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2011;14(5):328-38.
16. Dahlgren D, Roos C, Sjögren E, Lennernäs H. Direct in vivo human intestinal permeability ( $P_{\text{eff}}$ ) determined with different clinical perfusion and intubation methods. *J Pharm Sci.* 2015;104(9):2702-26.
17. FDA. Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. Guidance for industry. 2017.
18. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Biopharmaceutics Classification System-Based Biowaiver (M9); ICH Harmonised: Geneva, Switzerland, 2019.
19. Lennernäs H. Intestinal permeability and its relevance for absorption and elimination. *Xenobiotica.* 2007;37(10-11):1015-51.

20. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997;23(1-3):3-25.
21. Darvas F, Keseru G, Papp A, Dorman G, Urge L, Krajcsi P. In silico and ex silico ADME approaches for drug discovery. *Curr Top Med Chem.* 2002;2(12):1287-304.
22. Palm K, Luthman K, Ungell AL, Strandlund G, Artursson P. Correlation of drug absorption with molecular surface properties. *J Pharm Sci.* 1996;85(1):32-9.
23. Palm K, Stenberg P, Luthman K, Artursson P. Polar molecular surface properties predict the intestinal absorption of drugs in humans. *Pharm Res.* 1997;14(5):568-71.
24. Kelder J, Grootenhuis PD, Bayada DM, Delbressine LP, Ploemen J-P. Polar molecular surface as a dominating determinant for oral absorption and brain penetration of drugs. *Pharm Res.* 1999;16(10):1514-9.
25. Kubinyi H. Lipophilicity and biological activity. Drug transport and drug distribution in model systems and in biological systems. *Arzneimittel-Forschung.* 1979;29(8):1067-80.
26. Avdeef A, Testa B. Physicochemical profiling in drug research: a brief survey of the state-of-the-art of experimental techniques. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(10):1681-9.
27. Kramer S, Flynn G. Solubility of organic hydrochlorides. *J Pharm Sci.* 1972;61(12):1896-904.
28. Chowhan Z. pH-solubility profiles of organic carboxylic acids and their salts. *J Pharm Sci.* 1978;67(9):1257-60.
29. Li S, He H, Parthiban LJ, Yin H, Serajuddin AT. IV-IVC considerations in the development of immediate-release oral dosage form. *J Pharm Sci.* 2005;94(7):1396-417.
30. Nelson E. Solution rate of theophylline salts and effects from oral administration. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc.* 1957;46(10):607-14.
31. Nelson E. Comparative dissolution rates of weak acids and their sodium salts. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc.* 1958;47(4):297-9.
32. Berge SM, Bighley LD, Monkhouse DC. Pharmaceutical salts. *J Pharm Sci.* 1977;66(1):1-19.
33. Huang L-F, Tong W-QT. Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004;56(3):321-34.
34. Pudipeddi M, Serajuddin AT. Trends in solubility of polymorphs. *J Pharm Sci.* 2005;94(5):929-39.
35. Snider DA, Addicks W, Owens W. Polymorphism in generic drug product development. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004;56(3):391-5.
36. Censi R, Di Martino P. Polymorph Impact on the Bioavailability and Stability of Poorly Soluble Drugs. *Molecules.* 2015;20(10):18759-76.
37. Matsuda Y, Akazawa R, Teraoka R, Otsuka M. Pharmaceutical evaluation of carbamazepine modifications: comparative study for photostability of carbamazepine polymorphs by using Fourier-transformed reflection-absorption infrared spectroscopy and colorimetric measurement. *J Pharm Pharmacol.* 1994;46(3):162-7.
38. Chen X, Morris KR, Griesser UJ, Byrn SR, Stowell JG. Reactivity differences of indomethacin solid forms with ammonia gas. *J Am Chem Soc.* 2002;124(50):15012-9.
39. De Villiers M, Van der Watt J, Lötter A. Kinetic study of the solid-state photolytic degradation of two polymorphic forms of furosemide. *Int J Pharm.* 1992;88(1-3):275-83.
40. Eyjolfsson R. Enalapril maleate polymorphs: instability of form II in a tablet formulation. *Pharmazie.* 2002;57(5):347-8.
41. Singhal D, Curatolo W. Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004;56(3):335-47.
42. Shefter E, Higuchi T. Dissolution behavior of crystalline solvated and nonsolvated forms of some pharmaceuticals. *J Pharm Sci.* 1963;52:781-91.



43. Allen PV, Rahn PD, Sarapu AC, Vanderwielen AJ. Physical characterization of erythromycin: anhydrate, monohydrate, and dihydrate crystalline solids. *J Pharm Sci.* 1978;67(8):1087-93.
44. Mudie DM, Amidon GL, Amidon GE. Physiological parameters for oral delivery and in vitro testing. *Mol Pharm.* 2010;7(5):1388-405.
45. Balon K, Riebesehl B, Müller B. Drug liposome partitioning as a tool for the prediction of human passive intestinal absorption. *Pharm Res.* 1999;16(6):882-8.
46. Dahan AS, Amidon GL. Gastrointestinal dissolution and absorption of class II drugs. *Drug Bioavailability: Estimation of solubility, permeability, absorption bioavailability.* Weinheim: Wiley-VCH2008. p. 33-51.
47. Kalantzi L, Goumas K, Kalioras V, Abrahamsson B, Dressman JB, Reppas C. Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. *Pharm Res.* 2006;23(1):165-76.
48. Schmidt H, Fritzlär G, Dölle W, Goebell H. Comparative studies on the histamine and insulin stimulated acid pepsin secretion in patients suffering from ulcer duodeni and control persons. *Dtsch Med Wochenschr.* 1970;95(40):2011.
49. Lambert R, MARTIN P, Vagne M. Relationship between hydrogen ion and pepsin concentration in human gastric secretion. *Digestion.* 1968;1:65-77.
50. Vertzoni M, Dressman J, Butler J, Hempenstall J, Reppas C, Biopharmaceutics. Simulation of fasting gastric conditions and its importance for the in vivo dissolution of lipophilic compounds. *Eur J Pharm Biopharm.* 2005;60(3):413-7.
51. Armand M, Borel P, Pasquier B, Dubois C, Senft M, Andre M, et al. Physicochemical characteristics of emulsions during fat digestion in human stomach and duodenum. *Am J Physiol.* 1996;271(1):G172-G83.
52. Vertzoni M, Archontaki H, Reppas C. Determination of intraluminal individual bile acids by HPLC with charged aerosol detection. *J Lipid Res.* 2008;49(12):2690-5.
53. Rhodes J, Barnardo DE, Phillips SF, Rovelstad RA, Hofmann AF. Increased reflux of bile into the stomach in patients with gastric ulcer. *Gastroenterology.* 1969;57(3):241-52.
54. Widmaier EP, Hershel R, Strong KT. *The Digestion and Absorption of Food.* Vander's Human Physiology: The Mechanisms of Body Function 10 ed. New York: McGraw-Hill; 2006. 575-614.
55. Konturek P, Konturek S, Hahn E. Duodenal alkaline secretion: its mechanisms and role in mucosal protection against gastric acid. *Dig Liver Dis.* 2004;36(8):505-12.
56. Sunesen VH, Vedelsdal R, Kristensen HG, Christrup L, Müllertz A. Effect of liquid volume and food intake on the absolute bioavailability of danazol, a poorly soluble drug. *Eur J Pharm Sci.* 2005;24(4):297-303.
57. Leyden JJ. Absorption of minocycline hydrochloride and tetracycline hydrochloride: effect of food, milk, and iron. *J Am Acad Dermatol.* 1985;12(2):308-12.
58. Radwan A, Zaid AN, Jaradat N, Odeh Y. Food effect: The combined effect of media pH and viscosity on the gastrointestinal absorption of ciprofloxacin tablet. *Eur J Pharm Sci.* 2017;101:100-6.
59. Clarysse S, Psachoulias D, Brouwers J, Tack J, Annaert P, Duchateau G, et al. Postprandial changes in solubilizing capacity of human intestinal fluids for BCS class II drugs. *Pharm Res.* 2009;26(6):1456-66.
60. Rosoff M, Serajuddin AT. Solubilization of diazepam in bile salts and in sodium cholate- lecithin-water phases. *Int J Pharm.* 1980;6(2):137-46.
61. Mithani SD, Bakatselou V, TenHoor CN, Dressman JB. Estimation of the increase in solubility of drugs as a function of bile salt concentration. *Pharm Res.* 1996;13(1):163-7.
62. Cai X, Grant DJ, Wiedmann TS. Analysis of the solubilization of steroids by bile salt micelles. *J Pharm Sci.* 1997;86(3):372-7.

63. Clarysse S, Tack J, Lammert F, Duchateau G, Reppas C, Augustijns P. Postprandial evolution in composition and characteristics of human duodenal fluids in different nutritional states. *J Pharm Sci.* 2009;98(3):1177-92.
64. Brouwers J, Tack J, Lammert F, Augustijns P. Intraluminal drug and formulation behavior and integration in in vitro permeability estimation: a case study with amprenavir. *J Pharm Sci.* 2006;95(2):372-83.
65. Persson EM, Gustafsson A-S, Carlsson AS, Nilsson RG, Knutson L, Forsell P, et al. The effects of food on the dissolution of poorly soluble drugs in human and in model small intestinal fluids. *Pharm Res.* 2005;22(12):2141-51.
66. Dressman JB, Amidon GL, Reppas C, Shah VP. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. *Pharm Res.* 1998;15(1):11-22.
67. Ladas S, Isaacs P, Murphy G, Sladen G. Comparison of the effects of medium and long chain triglyceride containing liquid meals on gall bladder and small intestinal function in normal man. *Gut.* 1984;25(4):405-11.
68. Fausa O. Duodenal bile acids after a test meal. *Scand J Gastroenterol.* 1974.
69. \*Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res.* 1995;12(3):413-20.
70. Dahan A, Miller JM, Hilfinger JM, Yamashita S, Yu LX, Lennernäs H, et al. High-permeability criterion for BCS classification: segmental/pH dependent permeability considerations. *Mol Pharm.* 2010;7(5):1827-34.
71. Pandit NK. *Introduction to the pharmaceutical sciences: Lippincott Williams & Wilkins;* 2007.
72. Pedersen BL, Mullertz A, Brondsted H, Kristensen HG. A comparison of the solubility of danazol in human and simulated gastrointestinal fluids. *Pharm Res.* 2000;17(7):891.
73. Pedersen PB, Vilmann P, Bar-Shalom D, Müllertz A, Baldursdottir S. Characterization of fasted human gastric fluid for relevant rheological parameters and gastric lipase activities. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013;85(3):958-65.
74. Lindahl A, Ungell A-L, Knutson L, Lennernäs H. Characterization of fluids from the stomach and proximal jejunum in men and women. *Pharm Res.* 1997;14(4):497-502.
75. Press A, Hauptmann I, Hauptmann L, Fuchs B, Fuchs M, Ewe K, et al. Gastrointestinal pH profiles in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 1998;12(7):673-8.
76. Dressman JB, Berardi RR, Dermentzoglou LC, Russell TL, Schmaltz SP, Barnett JL, et al. Upper gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women. *Pharm Res.* 1990;7(7):756-61.
77. Koziolk M, Grimm M, Becker D, Iordanov V, Zou H, Shimizu J, et al. Investigation of pH and temperature profiles in the GI tract of fasted human subjects using the Intellicap® system. *J Pharm Sci.* 2015;104(9):2855-63.
78. Simonian HP, Vo L, Doma S, Fisher RS, Parkman HP. Regional postprandial differences in pH within the stomach and gastroesophageal junction. *Dig Dis Sci.* 2005;50(12):2276-85.
79. Sheng JJ, McNamara DP, Amidon GL. Toward an in vivo dissolution methodology: a comparison of phosphate and bicarbonate buffers. *Mol Pharm.* 2009;6(1):29-39.
80. Vertzoni M, Markopoulos C, Symillides M, Goumas C, Imanidis G, Reppas C. Luminal lipid phases after administration of a triglyceride solution of danazol in the fed state and their contribution to the flux of danazol across Caco-2 cell monolayers. *Mol Pharm.* 2012;9(5):1189-98.
81. Riethorst D, Mols R, Duchateau G, Tack J, Brouwers J, Augustijns P. Characterization of human duodenal fluids in fasted and fed state conditions. *J Pharm Sci.* 2016;105(2):673-81.
82. Parojčić J, Vasiljević D, Ibrić S, Djurić Z. Tablet disintegration and drug dissolution in viscous media: Paracetamol IR tablets. *Int J Pharm.* 2008;355(1-2):93-9.
83. Radwan A, Amidon GL, Langguth P. Mechanistic investigation of food effect on disintegration and dissolution of BCS class III compound solid formulations: the importance of viscosity. *Biopharm Drug Dispos.* 2012;33(7):403-16.

84. Cvijić S, Parojčić J, Langguth P. Viscosity-mediated negative food effect on oral absorption of poorly-permeable drugs with an absorption window in the proximal intestine: In vitro experimental simulation and computational verification. *Eur J Pharm Sci.* 2014;61:40-53.
85. Abrahamsson B, Pal A, Sjöberg M, Carlsson M, Laurell E, Brasseur JG. A novel in vitro and numerical analysis of shear-induced drug release from extended-release tablets in the fed stomach. *Pharm Res.* 2005;22(8):1215-26.
86. Marciani L, Gowland PA, Spiller RC, Manoj P, Moore RJ, Young P, et al. Gastric response to increased meal viscosity assessed by echo-planar magnetic resonance imaging in humans. *J Nutr.* 2000;130(1):122-7.
87. Radwan A, Wagner M, Amidon GL, Langguth P. Bio-predictive tablet disintegration: effect of water diffusivity, fluid flow, food composition and test conditions. *Eur J Pharm Sci.* 2014;57:273-9.
88. Mälkki Y. Physical properties of dietary fiber as keys to physiological functions. *Cereal Foods World.* 2001;46(5):196-9.
89. Jambhekar SS, Breen PJ. Drug dissolution: significance of physicochemical properties and physiological conditions. *Drug Discov Today.* 2013;18(23-24):1173-84.
90. Jantravid E, Janssen N, Reppas C, Dressman JB. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update. *Pharm Res.* 2008;25(7):1663.
91. Gisolfi C, Summers R, Lambert GP, Xia T. Effect of beverage osmolality on intestinal fluid absorption during exercise. *J Appl Physiol.* 1998;85(5):1941-8.
92. Davenport HW. *Physiology of the digestive tract.* 5 ed. Chicago, IL, London: Year Book Medical Publishers; 1982.
93. Koziolok M, Grimm M, Garbacz G, Kühn J-P, Weitschies W. Intra-gastric volume changes after intake of a high-caloric, high-fat standard breakfast in healthy human subjects investigated by MRI. *Mol Pharm.* 2014;11(5):1632-9.
94. Schiller C, Fröhlich CP, Giessmann T, Siegmund W, Mönnikes H, Hosten N, et al. Intestinal fluid volumes and transit of dosage forms as assessed by magnetic resonance imaging. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005;22(10):971-9.
95. Placidi E, Hoad C, Marciani L, Gowland P, Spiller R. PTH-045 Effects of an osmotic laxative on the distribution of water between the small and large intestine in humans. *Gut.* 2010;59:A141
96. Marciani L, Foley S, Hoad C, Campbell E, Totman J, Armstrong A, et al. Effects of Ondansetron on small bowel water content: a magnetic resonance imaging study. *Gut.* 2007;56:A333.
97. Marciani L, Cox EF, Hoad CL, Pritchard S, Totman JJ, Foley S, et al. Postprandial changes in small bowel water content in healthy subjects and patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* 2010;138(2):469-77. e1.
98. Higaki K, Choe SY, Löbenberg R, Welage LS, Amidon GL. Mechanistic understanding of time-dependent oral absorption based on gastric motor activity in humans. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;70(1):313-25.
99. Fleisher D, Li, Cheng., Zhou, Yuji., Pao, Li-Heng., Karim, Aziz. Drug, Meal and formulation interactions influencing drug absorption after oral administration. *Clin Pharmacokinet.* 2008;36(3):233-54.
100. Dressman JB. Comparison of canine and human gastrointestinal physiology. *Pharm Res.* 1986;3(3):123-31.
101. Queckenberg C, Fuhr U. Influence of posture on pharmacokinetics. *Eur J Clin Pharmacol.* 2009;65(2):109.
102. Heading RC, Nimmo J, Prescott LF, Tothill P. The dependence of paracetamol absorption on the rate of gastric emptying. *Br J Pharmacol.* 1973;47(2):415-21.
103. Kwiatek MA, Menne D, Steingoetter A, Goetze O, Forras-Kaufman Z, Kaufman E, et al. Effect of meal volume and calorie load on postprandial gastric function and emptying: studies under

- physiological conditions by combined fiber-optic pressure measurement and MRI. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009.
104. Weitschies W, Kosch O, Mönnikes H, Trahms L. Magnetic marker monitoring: an application of biomagnetic measurement instrumentation and principles for the determination of the gastrointestinal behavior of magnetically marked solid dosage forms. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57(8):1210-22.
  105. McConnell EL, Fadda HM, Basit AW. Gut instincts: explorations in intestinal physiology and drug delivery. *Int J Pharm*. 2008;364(2):213-26.
  106. Davis S, Hardy J, Fara J. Transit of pharmaceutical dosage forms through the small intestine. *Gut*. 1986;27(8):886-92.
  107. DeSesso J, Jacobson C. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food Chem Toxicol*. 2001;39(3):209-28.
  108. Mayerson M. Principles of drug absorption In: Banker GS RC, editor. *Modern Pharmaceutics*. New York: Marcel Dekker; 1996. p. 21-71.
  109. Caspary WF. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *Am J Clin Nutr*. 1992(55(1 Suppl)):299S-308S.
  110. Van der Merwe J, Steenekamp J, Steyn D, Hamman J. The role of functional excipients in solid oral dosage forms to overcome poor drug dissolution and bioavailability. *Pharmaceutics*. 2020;12(5):393.
  111. Dahlgren D. Biopharmaceutical aspects of intestinal drug absorption: Regional permeability and absorption-modifying excipients. Doctoral dissertation. Uppsala University, Disciplinary Domain of Medicine and Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacy. 2018;70
  112. Sjögren E, Abrahamsson B, Augustijns P, Becker D, Bolger MB, Brewster M, et al. In vivo methods for drug absorption—comparative physiologies, model selection, correlations with in vitro methods (IVIVC), and applications for formulation/API/excipient characterization including food effects. *Eur J Pharm Sci*. 2014;57:99-151.
  113. Monajjemzadeh F, Hassanzadeh D, Valizadeh H, Siah-Shadbad MR, Mojarrad JS, Robertson TA, et al. Compatibility studies of acyclovir and lactose in physical mixtures and commercial tablets. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009;73(3):404-13.
  114. Abdoh A, Al-Omari M, Badwan A, Jaber A. Amlodipine besylate—excipients interaction in solid dosage form. *Pharm Dev Technol*. 2004;9(1):15-24.
  115. Santos A, Basilio I, De Souza F, Medeiros A, Pinto M, De Santana D, et al. Application of thermal analysis in study of binary mixtures with metformin. *Therm Anal Calorim*. 2008;93(2):361-4.
  116. Botha S, Lötter A. Compatibility study between oxprenolol hydrochloride, temazepam and tablet excipients using differential scanning calorimetry. *Drug Dev Ind Pharm*. 1990;16(2):331-45.
  117. Voigt R, Pergande G, Keipert S. Comparative studies on the study of drug-excipient interactions with vapor pressure osmometry and equilibrium dialysis. *Die Pharmazie*. 1984;39(11):760-3.
  118. Telang C, Mujumdar S, Mathew M. Improved physical stability of amorphous state through acid base interactions. *J Pharm Sci*. 2009;98(6):2149-59.
  119. Vialpando M, Aerts A, Persoons J, Martens J, Van Den Mooter G. Evaluation of ordered mesoporous silica as a carrier for poorly soluble drugs: influence of pressure on the structure and drug release. *J Pharm Sci*. 2011;100(8):3411-20.
  120. McCarthy CA, Ahern RJ, Dontireddy R, Ryan KB, Crean AM. Mesoporous silica formulation strategies for drug dissolution enhancement: a review. *Expert Opin Drug Deliv*. 2016;13(1):93-108.
  121. Dahlgren D, Sjöblom M, Lennernäs H. Intestinal absorption-modifying excipients: A current update on preclinical in vivo evaluations. *Eur J Pharm Biopharm*. 2019;142:411-20.
  122. Chen M-L, Straughn A, Sadrieh N, Meyer M, Faustino P, Ciavarella A, et al. A modern view of excipient effects on bioequivalence: case study of sorbitol. *Pharm Res*. 2007;24(1):73-80.

123. Adkin DA, Davis SS, Sparrow RA, Huckle PD, Wilding IR. The effect of mannitol on the oral bioavailability of cimetidine. *J Pharm Sci.* 1995;84(12):1405-9.
124. Shaikh R, Singh TRR, Garland MJ, Woolfson AD, Donnelly RF. Mucoadhesive drug delivery systems. *J Pharm Bioallied Sci.* 2011;3(1):89.
125. Flanagan T. Potential for pharmaceutical excipients to impact absorption: A mechanistic review for BCS Class 1 and 3 drugs. *Eur J Pharm Biopharm.* 2019.
126. Roos C, Dahlgren D, Sjögren E, Sjöblom M, Hedeland M, Lennernäs H. Effects of absorption-modifying excipients on jejunal drug absorption in simulated fasted and fed luminal conditions. *Eur J Pharm Biopharm.* 2019;142:387-95.
127. Koziolk M, Alcaro S, Augustijns P, Basit AW, Grimm M, Hens B, et al. The mechanisms of pharmacokinetic food-drug interactions—A perspective from the UNGAP group. *Eur J Pharm Sci.* 2019;134:31-59.
128. Williams HD, Trevaskis NL, Charman SA, Shanker RM, Charman WN, Pouton CW, et al. Strategies to address low drug solubility in discovery and development. *Pharmacol Rev.* 2013;65(1):315-499.
129. Willemsen AE, Lubberman FJ, Tol J, Gerritsen WR, van Herpen CM, van Erp NP. Effect of food and acid-reducing agents on the absorption of oral targeted therapies in solid tumors. *Drug Discov Today.* 2016;21(6):962-76.
130. FDA/CDER, 2002. Guidance for Industry: Food-Effect Bioavailability and Fed Bioequivalence Studies.[Online].Dostupno na:<<http://www.fda.gov/downloads/regulatoryinformation/guidances/ucm126833.pdf>> [poslednji pristup 10. 4.2021. godine].
131. Hoad C, Marciani L, Foley S, Totman J, Wright J, Bush D, et al. Non-invasive quantification of small bowel water content by MRI: a validation study. *Phys Med Biol.* 2007;52(23):6909.
132. Marciani L, Pritchard SE, Hellier-Woods C, Costigan C, Hoad C, Gowland PA, et al. Delayed gastric emptying and reduced postprandial small bowel water content of equicaloric whole meal bread versus rice meals in healthy subjects: novel MRI insights. *Eur J Clin Nutr.* 2013;67(7):754-8.
133. Wilkinson-Smith VC, Major G, Ashleigh L, Murray K, Hoad CL, Marciani L, et al. Insights into the different effects of food on intestinal secretion using magnetic resonance imaging. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2018;42(8):1342-8.
134. Grimm M, Koziolk M, Saleh M, Schneider F, Garbacz G, Kühn J-P, et al. Gastric emptying and small bowel water content after administration of grapefruit juice compared to water and isocaloric solutions of glucose and fructose: a four-way crossover MRI pilot study in healthy subjects. *Mol Pharm.* 2018;15(2):548-59.
135. Murray K, Wilkinson-Smith V, Hoad C, Costigan C, Cox E, Lam C, et al. Differential effects of FODMAPs (fermentable oligo-, di-, mono-saccharides and polyols) on small and large intestinal contents in healthy subjects shown by MRI. *Am J Gastroenterol.* 2014;109(1):110.
136. Hussein MO, Hoad CL, Wright J, Singh G, Stephenson MC, Cox EF, et al. Fat emulsion intragastric stability and droplet size modulate gastrointestinal responses and subsequent food intake in young adults. *J Nutr.* 2015;145(6):1170-7.
137. Koenigsnecht MJ, Baker JR, Wen B, Frances A, Zhang H, Yu A, et al. In vivo dissolution and systemic absorption of immediate release ibuprofen in human gastrointestinal tract under fed and fasted conditions. *Mol Pharm.* 2017;14(12):4295-304.
138. Fadda HM, McConnell EL, Short MD, Basit AW. Meal-induced acceleration of tablet transit through the human small intestine. *Pharm Res.* 2009;26(2):356-60.
139. Kerlin P, Zinsmeister A, Phillips S. Relationship of motility to flow of contents in the human small intestine. *Gastroenterology.* 1982;82(4):701-6.
140. Kelly K, O'mahony B, Lindsay B, Jones T, Grattan TJ, Rostami-Hodjegan A, et al. Comparison of the rates of disintegration, gastric emptying, and drug absorption following

- administration of a new and a conventional paracetamol formulation, using  $\gamma$  scintigraphy. *Pharm Res.* 2003;20(10):1668-73.
141. Cole ET, Scott RA, Cade D, Connor AL, Wilding IR. In vitro and in vivo pharmacoscintigraphic evaluation of ibuprofen hypromellose and gelatin capsules. *Pharm Res.* 2004;21(5):793-8.
142. Digenis G, Sandefer E, Page R, Doll W, Gold T, Darwazeh N. Bioequivalence study of stressed and nonstressed hard gelatin capsules using amoxicillin as a drug marker and gamma scintigraphy to confirm time and GI location of in vivo capsule rupture. *Pharm Res.* 2000;17(5):572-82.
143. Abrahamsson B, Albery T, Eriksson A, Gustafsson I, Sjöberg M. Food effects on tablet disintegration. *Eur J Pharm Sci.* 2004;22(2-3):165-72.
144. Johnson FK, Ciric S, Boudriau S, Kisicki J, Stauffer J. Effects of alcohol on the pharmacokinetics of morphine sulfate and naltrexone hydrochloride extended release capsules. *J Clin Pharmacol.* 2012;52(5):747-56.
145. Fagerberg JH, Sjögren E, Bergström CA. Concomitant intake of alcohol may increase the absorption of poorly soluble drugs. *Eur J Pharm Sci.* 2015;67:12-20.
146. Fagerberg JH, Al-Tikriti Y, Ragnarsson G, Bergström CA. Ethanol effects on apparent solubility of poorly soluble drugs in simulated intestinal fluid. *Mol Pharm.* 2012;9(7):1942-52.
147. Bisphosphonates. In: Bartl R, Frisch B, von Tresckow E, Bartl C, editors. *Bisphosphonates in Medical Practice: Actions — Side Effects — Indications — Strategies.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2007. p. 33-70.
148. Neuvonen PJ. Interactions with the Absorption of Tetracyclines. *Drugs.* 1976;11(1):45-54.
149. Lomaestro BM, Bailie GR. Absorption Interactions With Fluoroquinolones. *Drug Saf.* 1995;12(5):314-33.
150. Stebler T, Guentert TW. Binding of Drugs in Milk: The Role of Casein in Milk Protein Binding. *Pharm Res.* 1990;7(6):633-7.
151. Chiou WL. The rate and extent of oral bioavailability versus the rate and extent of oral absorption: clarification and recommendation of terminology. *J Pharmacokinet Pharmacodyn.* 2001;28(1):3-6.
152. Burton PS, Goodwin JT, Vidmar TJ, Amore BM. Predicting drug absorption: how nature made it a difficult problem. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;303(3):889-95.
153. Kaplan SA. Biological implications of in vitro dissolution testing. In Leeson L, Cartensen JT, Eds. *Dissolution Technology: The Industrial Pharmaceutical Technology Section of Pharmaceutical Sciences,* Washington DC.1974. 167
154. Ku MS. Use of the biopharmaceutical classification system in early drug development. *AAPS J.* 2008;10(1):208-12.
155. Takagi T, Ramachandran C, Bermejo M, Yamashita S, Yu LX, Amidon GL. A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan. *Mol Pharm.* 2006;3(6):631-43.
156. \*Kasim NA, Whitehouse M, Ramachandran C, Bermejo M, Lennernas H, Hussain AS, et al. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Mol Pharm.* 2004;1(1):85-96.
157. Lindenberg M, Kopp S, Dressman JB. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004;58(2):265-78.
158. Cabrera-Pérez MÁ, Pham-The H, Cervera MF, Hernández-Armengol R, Miranda-Pérez de Alejo C, Brito-Ferrer Y. Integrating theoretical and experimental permeability estimations for provisional biopharmaceutical classification: Application to the WHO essential medicines. *Biopharm Drug Dispos.* 2018;39(7):354-68.
159. Nair AK, Anand O, Chun N, Conner DP, Mehta MU, Nhu DT, et al. Statistics on BCS classification of generic drug products approved between 2000 and 2011 in the USA. *AAPS J.* 2012;14(4):664-6.

160. Dahan A, Miller JM, Amidon GL. Prediction of solubility and permeability class membership: provisional BCS classification of the world's top oral drugs. *AAPS J.* 2009;11(4):740-6.
161. Yu LX, Amidon GL, Polli JE, Zhao H, Mehta MU, Conner DP, et al. Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. *Pharm Res.* 2002;19(7):921-5.
162. \*Yazdanian M KB, Corinne Jankovsky, Amale Hawi. The "High Solubility" Definition of the Current FDA Guidance on Biopharmaceutical Classification System May Be Too Strict for Acidic Drugs. *Pharm Res.* 2004;21(2):293-9.
163. Wu CY, Benet LZ. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm Res.* 2005;22(1):11-23.
164. Butler JM, Dressman JB. The developability classification system: application of biopharmaceutics concepts to formulation development. *J Pharm Sci.* 2010;99(12):4940-54.
165. Tsume Y, Amidon GL. The biowaiver extension for BCS class III drugs: the effect of dissolution rate on the bioequivalence of BCS class III immediate-release drugs predicted by computer simulation. *Mol Pharm.* 2010;7(4):1235-43.
166. Sugano K. Fraction of a dose absorbed estimation for structurally diverse low solubility compounds. *Int J Pharm.* 2011;405(1-2):79-89.
167. Tsume Y, Mudie DM, Langguth P, Amidon GE, Amidon GL. The Biopharmaceutics Classification System: subclasses for in vivo predictive dissolution (IPD) methodology and IVIVC. *Eur J Pharm Sci.* 2014;57:152-63.
168. Rinaki E, Valsami G, Macheras P. Quantitative biopharmaceutics classification system: The central role of dose/solubility ratio. *Pharm Res.* 2003;20(12):1917-25.
169. Bergström CA, Strafford M, Lazorova L, Avdeef A, Luthman K, Artursson P. Absorption classification of oral drugs based on molecular surface properties. *J Med Chem.* 2003;46(4):558-70.
170. Macheras P, Iliadis A. Modeling in biopharmaceutics, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Interdiscip Appl Math.* 2006;30:3-14.
- 171.\* Benet LZ, Broccatelli F, Oprea TI. BDDCS applied to over 900 drugs. *AAPS J.* 2011;13(4):519-47.
172. Broccatelli F, Cruciani G, Benet LZ, Oprea TI. BDDCS class prediction for new molecular entities. *Mol Pharm.* 2012;9(3):570-80.
173. EMA Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on the investigation of bioequivalence. 2010.
174. Rosenberger J, Butler J, Muenster U, Dressman J. Application of a Refined Developability Classification System. *J Pharm Sci.* 2019;108(3):1090-100.
175. Macheras P, Karalis V. A non-binary biopharmaceutical classification of drugs: The ABF system. *Int J Pharm.* 2014;464(1-2):85-90.
176. Li M, Zhao P, Pan Y, Wagner C. Predictive performance of physiologically based pharmacokinetic models for the effect of food on oral drug absorption: current status. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* 2018;7(2):82-9.
177. Pentafragka C, Symillides M, McAllister M, Dressman J, Vertzoni M, Reppas C. The impact of food intake on the luminal environment and performance of oral drug products with a view to in vitro and in silico simulations: a PEARRL review. *J Pharm Pharmacol.* 2019;71(4):557-80.
178. Kalantzi L, Page R, Nicolaidis E, Digenis G, Reppas C. In vitro methods can forecast the effects of intragastric residence on dosage form performance. *Eur J Pharm Sci.* 2008;33(4-5):445-51.
179. Galia E, Nicolaidis E, Hörter D, Löbenberg R, Reppas C, Dressman JB. Evaluation of Various Dissolution Media for Predicting In Vivo Performance of Class I and II Drugs. *Pharm Res.* 1998;15(5):698-705.
180. Franek F, Holm P, Larsen F, Steffansen B. Interaction between fed gastric media (Ensure Plus®) and different hypromellose based caffeine controlled release tablets: Comparison and

- mechanistic study of caffeine release in fed and fasted media versus water using the USP dissolution apparatus 3. *Int J Pharm.* 2014;461(1-2):419-26.
181. Williams HD, Nott KP, Barrett DA, Ward R, Hardy IJ, Melia CD. Drug release from HPMC matrices in milk and fat-rich emulsions. *J Pharm Sci.* 2011;100(11):4823-35.
182. Andreas CJ, Chen Y-C, Markopoulos C, Reppas C, Dressman J. In vitro biorelevant models for evaluating modified release mesalamine products to forecast the effect of formulation and meal intake on drug release. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015;97:39-50.
183. Vertzoni M, Diakidou A, Chatziliias M, Söderlind E, Abrahamsson B, Dressman JB, et al. Biorelevant media to simulate fluids in the ascending colon of humans and their usefulness in predicting intracolonic drug solubility. *Pharm Res.* 2010;27(10):2187-96.
184. Markopoulos C, Andreas CJ, Vertzoni M, Dressman J, Reppas C. In-vitro simulation of luminal conditions for evaluation of performance of oral drug products: choosing the appropriate test media. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015;93:173-82.
185. Georgaka D, Butler J, Kesisoglou F, Reppas C, Vertzoni M. Evaluation of dissolution in the lower intestine and its impact on the absorption process of high dose low solubility drugs. *Mol Pharm.* 2017;14(12):4181-91.
186. Lehto P, Kortejärvi H, Liimatainen A, Ojala K, Kangas H, Hirvonen J, et al. Use of conventional surfactant media as surrogates for FaSSiF in simulating in vivo dissolution of BCS class II drugs. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011;78(3):531-8.
187. Zoeller T, Klein S. Simplified biorelevant media for screening dissolution performance of poorly soluble drugs. *Dissolution Technol.* 2007;14(4):8-13.
188. Kostewicz ES, Abrahamsson B, Brewster M, Brouwers J, Butler J, Carlert S, et al. In vitro models for the prediction of in vivo performance of oral dosage forms. *Eur J Pharm Sci.* 2014;57:342-66.
189. Wickham M, Faulks R, Mills C. In vitro digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown. *Mol Nutr Food Res.* 2009;53(8):952-8.
190. Minekus M, Marteau P, Havenaar R. Multicompartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine. *ATLA.* 1995.
191. Minekus M, Smeets-Peeters M, Bernalier A, Marol-Bonnin S, Havenaar R, Marteau P, et al. A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1999;53(1):108-14.
192. Koziolok M, Görke K, Neumann M, Garbacz G, Weitschies W. Development of a bio-relevant dissolution test device simulating mechanical aspects present in the fed stomach. *Eur J Pharm Sci.* 2014;57:250-6.
193. Blanquet S, Zeijdner E, Beyssac E, Meunier J-P, Denis S, Havenaar R, et al. A dynamic artificial gastrointestinal system for studying the behavior of orally administered drug dosage forms under various physiological conditions. *Pharm Res.* 2004;21(4):585-91.
194. Souliman S, Blanquet S, Beyssac E, Cardot J-M. A level A in vitro/in vivo correlation in fasted and fed states using different methods: applied to solid immediate release oral dosage form. *Eur J Pharm Sci.* 2006;27(1):72-9.
195. Naylor T, Connolly P, Martini L, Elder D, Minekus M, Havenaar R, et al. Use of a gastrointestinal model and Gastroplus™ for the prediction of in vivo performance. *Appl Ther Res.* 2006;6(1):15.
196. Tenjarla S, Romasanta V, Zeijdner E, Villa R, Moro L. Release of 5-aminosalicylate from an MMX mesalamine tablet during transit through a simulated gastrointestinal tract system. *Adv Ther.* 2007;24(4):826-40.
197. Bellmann S, Lelieveld J, Gorissen T, Minekus M, Havenaar R. Development of an advanced in vitro model of the stomach and its evaluation versus human gastric physiology. *Food Res Int.* 2016;88:191-8.



198. Van Den Abeele J, Schilderink R, Schneider F, Mols R, Minekus M, Weitschies W, et al. Gastrointestinal and systemic disposition of diclofenac under fasted and fed state conditions supporting the evaluation of in vitro predictive tools. *Mol Pharm*. 2017;14(12):4220-32.
199. Rowland M, Peck C, Tucker G. Physiologically-based pharmacokinetics in drug development and regulatory science. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2011;51:45-73.
200. Kostewicz ES, Aarons L, Bergstrand M, Bolger MB, Galetin A, Hatley O, et al. PBPK models for the prediction of in vivo performance of oral dosage forms. *Eur J Pharm Sci*. 2014;57:300-21.
201. SimulationsPlus. GastroPlus v 9.8.1 Brochure. Available from: <https://www.simulations-plus.com/assets/GP-9.8-12-29-2020.pdf>.
202. Agoram B, Woltosz WS, Bolger MB. Predicting the impact of physiological and biochemical processes on oral drug bioavailability. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;50 Suppl 1:S41-67.
203. SimulationsPlus. GastroPlus v 9.8.1 Brochure. [Online]. Dostupno na: <https://www.simulations-plus.com/assets/GP-9.8-12-29-2020.pdf> [poslednji pristup 7. 1.2021. godine].
204. De Buck SS, Sinha VK, Fenu LA, Gilissen RA, Mackie CE, Nijsen MJ. The prediction of drug metabolism, tissue distribution, and bioavailability of 50 structurally diverse compounds in rat using mechanism-based absorption, distribution, and metabolism prediction tools. *Drug Metab Dispos*. 2007;35(4):649-59.
205. Crison JR, Timmins P, Keung A, Upreti VV, Boulton DW, Scheer BJ. Biowaiver approach for biopharmaceutics classification system class 3 compound metformin hydrochloride using in silico modeling. *J Pharm Sci*. 2012;101(5):1773-82.
206. Mirza T, Bykadi SA, Ellison CD, Yang Y, Davit BM, Khan MA. Use of in vitro–in vivo correlation to predict the pharmacokinetics of several products containing a BCS class 1 drug in extended release matrices. *Pharm Res*. 2013;30(1):179-90.
207. Zhang H, Xia B, Sheng J, Heimbach T, Lin T-H, He H, et al. Application of physiologically based absorption modeling to formulation development of a low solubility, low permeability weak base: mechanistic investigation of food effect. *AAPS PharmSciTech*. 2014;15(2):400-6.
208. Markovic M, Zur M, Dahan A, Cvijić S. Biopharmaceutical characterization of rebamipide: The role of mucus binding in regional-dependent intestinal permeability. *Eur J Pharm Sci*. 2020;152:105440.
209. Yoo I, Alafairet P, Marinov M, Pena-Hernandez K, Gopidi R, Chang J-F, et al. Data mining in healthcare and biomedicine: a survey of the literature. *J Med Syst*. 2012;36(4):2431-48.
210. Gupta D. Data Analytics and Its Application in Various Industries. In: *Applied Analytics through Case Studies Using SAS and R*. Berkeley :Apress, CA; 2018.1-25.
211. Balakin KV. Pharmaceutical data mining: approaches and applications for drug discovery. Hoboken, NJ : Wiley; 2009. Balakin KV. Pharmaceutical data mining: approaches and applications for drug discovery. Hoboken, NJ : Wiley; 2009.
212. Ding S, Li H, Su C, Yu J, Jin F. Evolutionary artificial neural networks: a review. *Artificial Intelligence Review*. 2013;39(3):251-60.
213. Haykin S. *Neural Networks and Learning Machines*. 3rd ed. Upper Saddle River, NJ: Pearson Education, Inc; 2009.
214. Du KL, Swamy MNS. *Neural Networks and Statistical Learning*. London: Springer; 2019.
215. Prieto A, Prieto B, Ortigosa EM, Ros E, Pelayo F, Ortega J, et al. Neural networks: An overview of early research, current frameworks and new challenges. *Neurocomputing*. 2016;214:242-68.
216. Kassambara A. *Practical guide to cluster analysis in R:unsupervised machine learning*. STHDA; 2017.
217. Husson F, Josse J, Pages J. Principal component methods-hierarchical clustering-partitional clustering: why would we need to choose for visualizing data. Technical Report, Agrocampus. 2010.

218. Breiman L, Friedman J, Stone CJ, Olshen RA. Classification and Regression Trees. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC; 1984.
219. Tan PN, Steinbach M, Karpatne A, Kumar V. Introduction to Data Mining. New York, NY: Pearson; 2019.
220. Wang JTL, Zaki MJ, Toivonen H, Shasha D. Data Mining in Bioinformatics. London: Springer; 2006.
221. Hemanth DJ, Smys S. Computational Vision and Bio Inspired Computing. Cham, Switzerland: Springer; 2018.
222. Dašić D. Postupci ansambla stabala odluke. Završni rad. University of Zagreb. Faculty of Electrical Engineering and Computing. 2017;26.
223. Niwa T. Using General Regression and Probabilistic Neural Networks To Predict Human Intestinal Absorption with Topological Descriptors Derived from Two-Dimensional Chemical Structures. *J Chem Inf Comput Sci.* 2003;43(1):113-9.
224. Wessel MD, Jurs PC, Tolan JW, Muskal SM. Prediction of Human Intestinal Absorption of Drug Compounds from Molecular Structure. *J Chem Inf Comput Sci.* 1998;38(4):726-35.
225. Dorronsoro I, Chana A, Abasolo MI, Castro A, Gil C, Stud M, et al. CODES/Neural Network Model: a useful tool for in silico prediction of oral absorption and blood-brain barrier permeability of structurally diverse drugs. *QSAR Comb Sci.* 2004;23(2-3):89-98.
226. Paixão P, Gouveia LF, Morais JAG. Prediction of the in vitro permeability determined in Caco-2 cells by using artificial neural networks. *Eur J Pharm Sci.* 2010;41(1):107-17.
227. Fujiwara S-i, Yamashita F, Hashida M. Prediction of Caco-2 cell permeability using a combination of MO-calculation and neural network. *Int J Pharm.* 2002;237(1):95-105.
228. Di Fenza A, Alagona G, Ghio C, Leonardi R, Giolitti A, Madami A. Caco-2 cell permeability modelling: a neural network coupled genetic algorithm approach. *J Comput Aided Mol Des.* 2007;21(4):207-21.
229. Diukendjieva A, Tsakovska I, Alov P, Pencheva T, Pajeva I, Worth AP, et al. Advances in the prediction of gastrointestinal absorption: Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) modelling of PAMPA permeability. *Comput Toxicol* 2019;10:51-9.
230. Chatzizacharia K, Hatziavramidis D. New frames of reference for mapping drugs in the four classes of the BCS and BDDCS into regions with clear boundaries. *AICHE Journal.* 2015;61(11):3570-9.
231. Dausani C, Macheras P, Karalis V. Understanding the Linkage between Pharmacokinetic Properties and the Two Classification Systems: BCS and BDDCS. Denver, CO: AAPS Annual Meeting and Exposition; 2016.
232. Khandelwal A, Bahadduri PM, Chang C, Polli JE, Swaan PW, Ekins S. Computational models to assign biopharmaceutics drug disposition classification from molecular structure. *Pharm Res.* 2007;24(12):2249-62.
233. Pham-The H, Garrigues T, Bermejo M, Gonzalez-Alvarez I, Monteagudo MC, Cabrera-Perez MA. Provisional classification and in silico study of biopharmaceutical system based on caco-2 cell permeability and dose number. *Mol Pharm.* 2013;10(6):2445-61.
234. Esaki T, Ohashi R, Watanabe R, Natsume-Kitatani Y, Kawashima H, Nagao C, et al. Constructing an In Silico Three-Class Predictor of Human Intestinal Absorption With Caco-2 Permeability and Dried-DMSO Solubility. *J Pharm Sci.* 2019.
235. Hou T, Wang J, Li Y. ADME Evaluation in Drug Discovery. 8. The Prediction of Human Intestinal Absorption by a Support Vector Machine. *J Chem Inf Model.* 2007;47(6):2408-15.
236. Newby D, Freitas AA, Ghafourian T. Comparing multilabel classification methods for provisional biopharmaceutics class prediction. *Mol Pharm.* 2014;12(1):87-102.
237. Newby D, Freitas AA, Ghafourian T. Decision trees to characterise the roles of permeability and solubility on the prediction of oral absorption. *Eur J Med Chem.* 2015;90:751-65.
238. Rinaki E, Dokoumetzidis A, Macheras P. The mean dissolution time depends on the dose/solubility ratio. *Pharm Res.* 2003;20(3):406-8.

239. Macheras P, Karalis V, Valsami G. Keeping a critical eye on the science and the regulation of oral drug absorption: a review. *J Pharm Sci.* 2013;102(9):3018-36.
240. Winiwarter S, Bonham NM, Ax F, Hallberg A, Lennernas H, Karlen A. Correlation of human jejunal permeability (in vivo) of drugs with experimentally and theoretically derived parameters. A multivariate data analysis approach. *J Med Chem.* 1998;41(25):4939-49.
241. Winiwarter S, Ax F, Lennernas H, Hallberg A, Pettersson C, Karlen A. Hydrogen bonding descriptors in the prediction of human in vivo intestinal permeability. *J Mol Graph Model.* 2003;21(4):273-87.
242. Kim S, Thiessen PA, Bolton EE, Chen J, Fu G, Gindulyte A, et al. PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D1202-13.
243. Tropsha A, Gramatica P, Gombar VK. The importance of being earnest: validation is the absolute essential for successful application and interpretation of QSPR models. *QSAR Comb Sci.* 2003;22(1):69-77.
244. Jolliffe IT: Choosing a subset of principal components or variables. In: *Principal component analysis.* 2nd ed. New York: Springer-Verlag; 2002. 111-149.
245. Lê S, Josse J, Husson F. FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *J Stat Softw.* 2008;25(1):1-18.
246. James G, Witten D, Hastie T, Tibshirani R. *An introduction to statistical learning*: Springer; 2013.
247. Therneau T, Atkinson B, Ripley B, Ripley MB. Package 'rpart'. [Online]. Dostupno na: <https://cran.r-project.org/web/packages/rpart/rpart.pdf> [poslednji pristup 30.5.2020.godine]
248. Kuhn M, Wind J, Weston S, Williams A, Keefer C, Engelhardt A, et al. caret: Classification and regression training R package ver 6.0–84. [Online]. Dostupno na: <https://cran.r-project.org/web/packages/caret/index.html> [poslednji pristup 30.5.2020.godine].
249. Branco P, Ribeiro RP, Torgo L. UBL: an R package for utility-based learning [Online]. Dostupno na: <https://arxiv.org/abs/1604.08079> [poslednji pristup 30.5.2020.godine].
250. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *biometrics.* 1977:159-74.
251. Kuhn M. Variable importance using the caret package. [Online]. Dostupno na: <http://ftp.uni-bayreuth.de/math/statlib/R/CRAN/doc/vignettes/caret/caretVarImp.pdf> [poslednji pristup 30.5.2020.godine].
252. Convention USP. *United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 41-NF 36)*. 2018.
253. Taupitz T, Klein S. Can biorelevant media be simplified by using SLS and Tween 80 to replace bile compounds. *Open Drug Deliv J.* 2010;4(SPEC. ISSUE 1):30-7.
254. Marques M. Dissolution media simulating fasted and fed states. *Dissolut Technol.* 2004;11(2):16-9.
255. Klein S. The use of biorelevant dissolution media to forecast the in vivo performance of a drug. *AAPS J.* 2010;12(3):397-406.
256. Medarević D, Cvijić S, Dobričić V, Mitrić M, Djuriš J, Ibrić S. Assessing the potential of solid dispersions to improve dissolution rate and bioavailability of valsartan: In vitro-in silico approach. *Eur J Pharm Sci.* 2018;124:188-98.
257. Mathias N, Xu Y, Vig B, Kestur U, Saari A, Crison J, et al. Food Effect in Humans: Predicting the Risk Through In Vitro Dissolution and In Vivo Pharmacokinetic Models. *AAPS J.* 2015;17(4):988-98.
258. FIP. Biowaiver monographs. [Online]. Dostupno na: [https://www.fip.org/bcs\\_monographs](https://www.fip.org/bcs_monographs) [poslednji pristup 1.5.2021. godine].
- 259.\* Fisher Scientific. Fluvastatin sodium salt, ACROS Organics™. [Online]. Dostupno na: <https://www.fishersci.com/shop/products/fluvastatin-sodium-salt-acros-organics-2/AC458010010> [poslednji pristup 1.2.2021. godine].
- 260.\* Aulton M, Taylor K. *Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines*. Edinburgh: Churchill Livingstone Elsevier; 2013.

- 261.\* Varma MV, Gardner I, Steyn SJ, Nkansah P, Rotter CJ, Whitney-Pickett C, et al. pH-Dependent solubility and permeability criteria for provisional biopharmaceutics classification (BCS and BDDCS) in early drug discovery. *Mol Pharm*. 2012;9(5):1199-212.
- 262.\* Jinno J, Oh D, Crison JR, Amidon GL. Dissolution of ionizable water-insoluble drugs: the combined effect of pH and surfactant. *J Pharm Sci*. 2000;89(2):268-74.
- 263.\* Yalkowsky S, Yan H. *Handbook of Aqueous Solubility Data*. Florida: CRC Press LLC. 2003.
264. McFarland JW, Avdeef A, Berger CM, Raevsky OA. Estimating the water solubilities of crystalline compounds from their chemical structures alone. *J Chem Inf Comput Sci*. 2001;41(5):1355-9.
265. \*Takka S, Rajbhandari S, Sakr A. Effect of anionic polymers on the release of propranolol hydrochloride from matrix tablets. *Eur J Pharm Biopharm*. 2001;52(1):75-82.
266. \*Vogelpoel H, Welink J, Amidon GL, Junginger HE, Midha KK, Moller H, et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms based on biopharmaceutics classification system (BCS) literature data: verapamil hydrochloride, propranolol hydrochloride, and atenolol. *J Pharm Sci*. 2004;93(8):1945-56.
267. \*Glomme A, Marz J, Dressman JB. Comparison of a miniaturized shake-flask solubility method with automated potentiometric acid/base titrations and calculated solubilities. *J Pharm Sci*. 2005;94(1):1-16.
268. \*Florey K. *Analytical Profiles of Drug Substances, Volume 15*. Orlando: Academic Press, Inc.;1986.3-34.
269. \*Beauchamp L, Orr G, de Miranda dP, Bumette T, Krenitsky T. Amino acid ester prodrugs of acyclovir. *Antivir Chem Chemother*. 1992;3(3):157-64.
270. \*Tran HT, Park JB, Hong KH, Choi HG, Han HK, Lee J, et al. Preparation and characterization of pH-independent sustained release tablet containing solid dispersion granules of a poorly water-soluble drug. *Int J Pharm*. 2011;415(1-2):83-8.
271. \*Verbeeck RK, Kanfer I, Lobenberg R, Abrahamsson B, Cristofolletti R, Groot DW, et al. Biowaiver Monographs for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms: Enalapril. *J Pharm Sci*. 2017;106(8):1933-43.
272. \*Wagner D, Glube N, Berntsen N, Tremel W, Langguth P. Different dissolution media lead to different crystal structures of talinolol with impact on its dissolution and solubility. *Drug Dev Ind Pharm*. 2003;29(8):891-902.
273. \*Granero GE, Longhi MR, Mora MJ, Junginger HE, Midha KK, Shah VP, et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: furosemide. *J Pharm Sci*. 2010;99(6):2544-56.
274. \*Kortejarvi H, Yliperttula M, Dressman JB, Junginger HE, Midha KK, Shah VP, et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: ranitidine hydrochloride. *J Pharm Sci*. 2005;94(8):1617-25.
275. \*Desai D, Wong B, Huang Y, Ye Q, Tang D, Guo H, et al. Surfactant-mediated dissolution of metformin hydrochloride tablets: wetting effects versus ion pairs diffusivity. *J Pharm Sci*. 2014;103(3):920-6.
276. \*Ghosh TK, Jasti BR. *Theory and practice of contemporary pharmaceuticals*. Boca Raton: CRC Press; 2005.
277. \*Jain A, Nayak S, Soni V. Iontophoretic permeation of lisinopril at different current densities and drug concentrations. *Adv Pharm Bull*. 2012;2(2):239-44.
278. \*Etman MA, Naggar VF. Thermodynamics of paracetamol solubility in sugar-water cosolvent systems. *Int J Pharm*. 1990;58(3):177-84.
279. \*Parasrampur J, Das Gupta V. Development of oral liquid dosage forms of acetazolamide. *J Pharm Sci*. 1990;79(9):835-6.
280. \*Riess W, Stierlin H, Degen P, Faigle JW, Gerardin A, Moppert J, et al. Pharmacokinetics and metabolism of the anti-inflammatory agent Voltaren. *Scand J Rheumatol Suppl*. 1978;7(22):17-29.

281. \*Petruševska M, Berglez S, Krisch I, Legen I, Megušar K, Peternel L, et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: levetiracetam. *J Pharm Sci.* 2015;104(9):2676-87.
282. \*Frick A, Moller H, Wirbitzki E. Biopharmaceutical characterization of oral immediate release drug products. In vitro/in vivo comparison of phenoxymethylpenicillin potassium, glimepiride and levofloxacin. *Eur J Pharm Biopharm.* 1998;46(3):305-11.
283. \*Becker C, Dressman JB, Amidon GL, Junginger HE, Kopp S, Midha KK, et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: pyrazinamide. *J Pharm Sci.* 2008;97(9):3709-20.
284. \*Dezani AB, Pereira TM, Caffaro AM, Reis JM, Serra CHdR. Equilibrium solubility versus intrinsic dissolution: characterization of lamivudine, stavudine and zidovudine for BCS classification. *Brazilian J Pharm Sci.* 2013;49(4):853-63.
285. \*Lund W. *The pharmaceutical codex : principles and practice of pharmaceutics.* London: The Pharmaceutical Press; 1994.
286. \*Dahan A, Wolk O, Zur M, Amidon GL, Abrahamsson B, Cristofolletti R, et al. Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: codeine phosphate. *J Pharm Sci.* 2014;103(6):1592-600.
287. \*Ogata H, Aoyagi N, Kaniwa N, Shibazaki T, Ejima E, Takagishi Y, et al. Bioavailability of metronidazole from sugar-coated tablets in humans. I. Effect of gastric acidity and correlation with in vitro dissolution rate. *Int J Pharm.* 1985;23(3):277-88.
288. \*Charoo N, Cristofolletti R, Graham A, Lartey P, Abrahamsson B, Groot DW, et al. Biowaiver monograph for immediate-release solid oral dosage forms: fluconazole. *J Pharm Sci.* 2014;103(12):3843-58.
289. \*Stosik AG, Junginger HE, Kopp S, Midha KK, Shah VP, Stavchansky S, et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: metoclopramide hydrochloride. *J Pharm Sci.* 2008;97(9):3700-8.
290. \*Dressman JB, Nair A, Abrahamsson B, Barends DM, Groot DW, Kopp S, et al. Biowaiver monograph for immediate-release solid oral dosage forms: acetylsalicylic acid. *J Pharm Sci.* 2012;101(8):2653-67.
291. \*Strauch S, Dressman JB, Shah VP, Kopp S, Polli JE, Barends DM. Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: quinine sulfate. *J Pharm Sci.* 2012;101(2):499-508.
292. McEvoy GK. *AHFS drug information 2010.* Bethesda, Md.: American Society of Health-System Pharmacists; 2010.
293. \*Augustijns P, Wuyts B, Hens B, Annaert P, Butler J, Brouwers J. A review of drug solubility in human intestinal fluids: implications for the prediction of oral absorption. *Eur J Pharm Sci.* 2014;57:322-32.
294. \*Becker C, Dressman JB, Amidon GL, Junginger HE, Kopp S, Midha KK, et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: ethambutol dihydrochloride. *J Pharm Sci.* 2008;97(4):1350-60.
295. \*Strauch S, Jantratid E, Dressman JB, Junginger HE, Kopp S, Midha KK, et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: mefloquine hydrochloride. *J Pharm Sci.* 2011;100(1):11-21.
296. \*Nair A, Abrahamsson B, Barends DM, Groot DW, Kopp S, Polli JE, et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: amodiaquine hydrochloride. *J Pharm Sci.* 2012;101(12):4390-401.
297. \*Hayton WL, Guttman DE, Levy G. Effect of complex formation on drug absorption XI: Complexation of prednisone and prednisolone with dialkylpropionamides and its effect on prednisone transfer through an artificial lipoid barrier. *J Pharm Sci.* 1972;61(3):356-61.
298. \*Potthast H, Dressman JB, Junginger HE, Midha KK, Oeser H, Shah VP, et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: ibuprofen. *J Pharm Sci.* 2005;94(10):2121-31.

299. \*Charoo NA, Shamsheer AA, Lian LY, Abrahamsson B, Cristofolletti R, Groot DW, et al. Biowaiver monograph for immediate-release solid oral dosage forms: bisoprolol fumarate. *J Pharm Sci.* 2014;103(2):378-91.
300. \*Florey K. Analytical profiles of drug substances. Vol. 18. San Diego: Academic; 1989.
301. \*Becker C, Dressman JB, Amidon GL, Junginger HE, Kopp S, Midha KK, et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: isoniazid. *J Pharm Sci.* 2007;96(3):522-31.
302. \*Romañuk CB. Caracterización Biofarmacéutica y Farmacotécnica de Derivados Farmacéuticos de Anticribianos Fluoroquinolónicos. Master Thesis. Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Ciencias Farmacéuticas. 2010.219.
303. \*Shojaei AH, Berner B, Li X. Transbuccal delivery of acyclovir: I. In vitro determination of routes of buccal transport. *Pharm Res.* 1998;15(8):1182-8.
304. \*Cristofolletti R, Nair A, Abrahamsson B, Groot DW, Kopp S, Langguth P, et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: efavirenz. *J Pharm Sci.* 2013;102(2):318-29.
305. \*Office of Generic Drugs Center for Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration Scientific. Electronic Orange Book, Approved Drug Products with Therapeutic Equivalence Evaluations, 41st ed. [Online]. Dostupno na: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/ob/index.cfm> [poslednji pristup 4.4. 2021. godine].
306. \*Lennernas H. Intestinal permeability and its relevance for absorption and elimination. *Xenobiotica.* 2007;37(10-11):1015-51.
307. \*Larregieu C, Benet L. Distinguishing between the permeability relationships with absorption and metabolism to improve BCS and BDDCS predictions in early drug discovery. *Mol Pharm.* 2014;11(4):1335-44.
308. \*Kim S, Chen J, Cheng T, Gindulyte A, He J, He S, et al. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic Acids Res.* 2018;47(D1):D1102-D9.
309. \*Josefsson M, Zackrisson A-L, Ahlner J. Effect of grapefruit juice on the pharmacokinetics of amlodipine in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.* 1996;51(2):189-93.
310. \*Sauer J-M, Ring BJ, Witcher JW. Clinical pharmacokinetics of atomoxetine. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(6):571-90.
311. \*Sauer J-M, Ponsler GD, Mattiuz EL, Long AJ, Witcher JW, Thomasson HR, et al. Disposition and metabolic fate of atomoxetine hydrochloride: the role of CYP2D6 in human disposition and metabolism. *Drug Metab Dispos.* 2003;31(1):98-107.
312. \*Yu G, Li G-F, Markowitz JS. Atomoxetine: a review of its pharmacokinetics and pharmacogenomics relative to drug disposition. *J Child Adolesc Psychopharmacol.* 2016;26(4):314-26.
313. \*Thomas S, Brightman F, Gill H, Lee S, Pufong B. Simulation modelling of human intestinal absorption using Caco-2 permeability and kinetic solubility data for early drug discovery. *J Pharm Sci.* 2008;97(10):4557-74.
314. \*Waldmeier F, Kaiser G, Ackermann R, Faigle J, Wagner J, Barner A, et al. The disposition of [<sup>14</sup>C]-labelled benazepril HCl in normal adult volunteers after single and repeated oral dose. *Xenobiotica.* 1991;21(2):251-61.
315. \*Mishina EV. Clinical Pharmacology Review NDA 19,851, Lotensin. [Online]. Dostupno na: <https://www.fda.gov/media/87097/download> [poslednji pristup 4.4. 2021. godine].
316. \*Eeckman F, Berwaer M, Fanara D, inventors. Pharmaceutical compositions comprising brivaracetam. United States patent US8435564B2. 2009 May 28.
317. \*Otoul C, Watanabe S, McCabe S, Stockis A. Relative Bioavailability and Bioequivalence of Brivaracetam 10 mg/mL Oral Solution and 50-mg Film-Coated Tablet. *Clin Pharmacol Drug Dev.* 2017;6(3):313.
318. \*Brayfield A. Martindale: The complete drug reference, 39th ed. London: Pharmaceutical Press; 2017.

319. \*Jin S-E, Park J-S, Kim C-K. Pharmacokinetics of oral calcitriol in healthy human based on the analysis with an enzyme immunoassay. *Pharmacol Res.* 2009;60(1):57-60.
320. \*Gu C-H, Li H, Levons J, Lentz K, Gandhi RB, Raghavan K, et al. Predicting effect of food on extent of drug absorption based on physicochemical properties. *Pharm Res.* 2007;24(6):1118-30.
321. \*Vertes V, Haynie R. Comparative pharmacokinetics of captopril, enalapril, and quinapril. *Am J Cardiol.* 1992;69(10):C8-C16.
322. \*Dalgaard L, Larsen C. Metabolism and excretion of citalopram in man: identification of O-acyl-and N-glucuronides. *Xenobiotica.* 1999;29(10):1033-41.
323. \*Gutierrez MM, Abramowitz W. Pharmacokinetic comparison of oral solution and tablet formulations of citalopram: a single-dose, randomized, crossover study. *Clin Ther.* 2000;22(12):1525-32.
324. \* Seyffart G. Drug dosage in renal insufficiency. Dordrecht: Springer Science & Business Media; 1991.
325. \*Marricco N, Bonhomme M, Spirito M, Offman E, Cassidy K. A comparative, randomized, single-dose, 2-way crossover bioavailability study of a clonazepam oral solution vs. tablets in healthy adult volunteers.: PIII-63. *Clin Pharmacol Ther.* 2012;91.
326. \* Pharmascience Inc. Product monograph Desloratadine allergy control (Desloratadine Tablets 5 mg). [Online]. Dostupno na: [https://pdf.hres.ca/dpd\\_pm/00047510.PDF](https://pdf.hres.ca/dpd_pm/00047510.PDF) [poslednji pristup 30.5.2020.godine].
327. \*Affrime M, Gupta S, Banfield C, Cohen A. A pharmacokinetic profile of desloratadine in healthy adults, including elderly. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41(1):13-9.
328. \*Ono A, Tomono T, Ogihara T, Terada K, Sugano K. Investigation of biopharmaceutical and physicochemical drug properties suitable for orally disintegrating tablets. *ADMET and DMPK.* 2016;4(4):335-60.
329. \*Tiseo P, Perdomo C, Friedhoff L. Metabolism and elimination of <sup>14</sup>C-donepezil in healthy volunteers: a single-dose study. *Br J Clin Pharmacol.* 1998;46(Suppl 1):19.
330. \*Yalkowsky SH, He Y, Jain P. Handbook of aqueous solubility data: CRC press; 2016.
331. \*Hunt CA, Jones RT. Tolerance and disposition of tetrahydrocannabinol in man. *J Pharmacol Exp Ther.* 1980;215(1):35-44.
332. \*Wall ME, Sadler BM, Brine D, Taylor H, Perez-Reyes M. Metabolism, disposition, and kinetics of delta-9-tetrahydrocannabinol in men and women. *Clin Pharmacol Ther.* 1983;34(3):352-63.
333. \*Parikh N, Kramer WG, Khurana V, Smith CC, Veticaden S. Bioavailability study of dronabinol oral solution versus dronabinol capsules in healthy volunteers. *Clinical pharmacology: advances and applications.* 2016;8:155.
334. \*Benfield P, Heel RC, Lewis SP. Fluoxetine. *Drugs.* 1986;32(6):481-508.
335. \*Moraes M, Lerner F, Corso G, Bezerra FF, Moraes M, De Nucci G. Fluoxetine bioequivalence study: quantification of fluoxetine and norfluoxetine by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *J Clin Pharmacol.* 1999;39(10):1053-61.
336. \* Wilson WI. CMC Review of Revised Labeling. [Online]. Dostupno na: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2008/022253s000\\_022254s000\\_ChemR.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2008/022253s000_022254s000_ChemR.pdf) [poslednji pristup 4.2. 2021. godine].
337. \*Cawello W, Bökens H, Nickel B, Andreas JO, Halabi A. Tolerability, pharmacokinetics, and bioequivalence of the tablet and syrup formulations of lacosamide in plasma, saliva, and urine: saliva as a surrogate of pharmacokinetics in the central compartment. *Epilepsia.* 2013;54(1):81-8.
338. \*Cawello W, Stockis A, Andreas JO, Dimova S. Advances in epilepsy treatment: lacosamide pharmacokinetic profile. *Ann N Y Acad Sci.* 2014;1329(1):18-32.
339. \*Sköld C, Winiwarter S, Wernevik J, Bergström F, Engström L, Allen R, et al. Presentation of a structurally diverse and commercially available drug data set for correlation and benchmarking studies. *J Med Chem.* 2006;49(23):6660-71.



340. \*Yannovits N, Zintzaras E, Pouli A, Koukoulis G, Lyberi S, Savari E, et al. A bioequivalence study of levothyroxine tablets versus an oral levothyroxine solution in healthy volunteers. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2006;31(2):73-8.
341. \*Budavari S, O'Neal M, Smith A, Heckelman P, Kinneary J. *The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals.* 12th edn. Whitehouse Station, NJ: Merck & Co. Inc. 1996.
342. \*Neubeck M, Fliser D, Pritsch M, Weisser K, Fliser M, Nussberger J, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of lisinopril in advanced renal failure. *Eur J Clin Pharmacol.* 1994;46(6):537-43.
343. \*Faure C. Role of antidiarrhoeal drugs as adjunctive therapies for acute diarrhoea in children. *Int J Pediatr.* 2013;2013.
344. \*Hardie DG. AMP-activated protein kinase as a drug target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:185-210.
345. \*Tucker G, Casey C, Phillips P, Connor H, Ward J, Woods H. Metformin kinetics in healthy subjects and in patients with diabetes mellitus. *Br J Clin Pharmacol.* 1981;12(2):235-46.
346. \*CDER.Approval letter (nicardipine). [Online]. Dostupno na: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/anda/98/74928ap\\_appltr\\_prntlbl\\_chemr.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/anda/98/74928ap_appltr_prntlbl_chemr.pdf) [poslednji pristup 4.2. 2019. godine].
347. \*Mignini F, Bisocchi D, Paglieri C, Streccioni V, Veglio F, Amenta F. Bioequivalence study of nicardipine solution versus nicardipine tablets. *Clin Exp Hypertens.* 2004;26(4):375-86.
348. \*Abdel-Rahman SM, Johnson FK, Gauthier-Dubois G, Weston IE, Kearns GL. The bioequivalence of nizatidine (Axid®) in two extemporaneously and one commercially prepared oral liquid formulations compared with capsule. *J Clin Pharmacol.* 2003;43(2):148-53.
349. \*Kwon J-W, Armbrust KL. Aqueous solubility, n-octanol–water partition coefficient, and sorption of five selective serotonin reuptake inhibitors to sediments and soils. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2008;81(2):128-35.
350. \*Kaye C, Haddock R, Langley P, Mellows G, Tasker T, Zussman B, et al. A review of the metabolism and pharmacokinetics of paroxetine in man. *Acta Psychiatrica Scandinavica.* 1989;80(S350):60-75.
351. \*Sindrup SH, Brøsen K, Gram LF, Hallas J, Skjelbo E, Allen A, et al. The relationship between paroxetine and the sparteine oxidation polymorphism. *Clin Pharmacol Ther.* 1992;51(3):278-87.
352. \*Ben-Menachem E. Pregabalin pharmacology and its relevance to clinical practice. *Epilepsia.* 2004;45:13-8.
353. \*Bockbrader HN, Radulovic LL, Posvar EL, Strand JC, Alvey CW, Busch JA, et al. Clinical pharmacokinetics of pregabalin in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol.* 2010;50(8):941-50.
354. \*Van Griensven J, Schoemaker R, Cohen A, Luus H, Seibert-Grafe M, Röthig H-J. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and bioavailability of the ACE inhibitor ramipril. *Eur J Clin Pharmacol.* 1995;47(6):513-8.
355. \*Gschwend MH, Guserle R, Erenmemişoğlu A, Martin W, Tamur U, Kanzik I, et al. Pharmacokinetics and bioequivalence study of ranitidine film tablets in healthy male subjects. *Arzneimittelforschung.* 2007;57(06):315-9.
356. \*Mannens G, Huang M, Meuldermans W, Hendrickx J, Woestenborghs R, Heykants J. Absorption, metabolism, and excretion of risperidone in humans. *Drug Metab Dispos.* 1993;21(6):1134-41.
357. \*van Schaick EA, Lechat P, Remmerie BM, Ko G, Lasseter KC, Mannaert E. Pharmacokinetic comparison of fast-disintegrating and conventional tablet formulations of risperidone in healthy volunteers. *Clin Ther.* 2003;25(6):1687-99.
358. \*Reverchon E, Della Porta G. Terbutaline microparticles suitable for aerosol delivery produced by supercritical assisted atomization. *Int J Pharm.* 2003;258(1-2):1-9.



359. \*Dyreborg A, Krogh N, Backer V, Rzeppa S, Hemmersbach P, Hostrup M. Pharmacokinetics of oral and inhaled terbutaline after exercise in trained men. *Front Pharmacol.* 2016;7:150.
360. \*Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 2017;46(D1):D1074-D82.
361. \*Izquierdo I, Borja J, Rovira S, Pelagio P, Torres F, Cebrecos J, et al. Comparative bioavailability study of triflusal oral solution vs. triflusal capsules in healthy subjects A single, randomized, two-way cross-over, open-label phase I study. *Arzneimittelforschung.* 2010;60(01):36-41.
362. \*Ramis J, Mis R, Forn J, Torrent J, Gorina E, Jane F. Pharmacokinetics of triflusal and its main metabolite HTB in healthy subjects following a single oral dose. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1991;16(4):269-73.
363. \*Granero G, Longhi M, Becker C, Junginger H, Kopp S, Midha K, et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Acetazolamide. *J Pharm Sci.* 2008;97(9):3691-9.
364. \*Hampson AJ, Babalonis S, Lofwall MR, Nuzzo PA, Krieter P, Walsh SL. A pharmacokinetic study examining acetazolamide as a novel adherence marker for clinical trials. *J Clin Psychopharmacol.* 2016;36(4):324.
365. \*Yuen K, Peh K, Billa N, Chan K, Toh W. Bioavailability and pharmacokinetics of acyclovir tablet preparation. *Drug Dev Ind Pharm.* 1998;24(2):193-6.
366. \*Hamon-Vilcot B, Chaufour S, Deschamps C, Canal M, Zieleniuk I, Ahtoy P, et al. Safety and pharmacokinetics of a single oral dose of amisulpride in healthy elderly volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.* 1998;54(5):405-9.
367. \*Charman WN, Porter CJ, Mithani S, Dressman JB. Physicochemical and physiological mechanisms for the effects of food on drug absorption: the role of lipids and pH. *J Pharm Sci.* 1997;86(3):269-82.
368. \*Nixon GL, Moss DM, Shone AE, Lalloo DG, Fisher N, O'Neill PM, et al. Antimalarial pharmacology and therapeutics of atovaquone. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(5):977-85.
369. \* GlaxoSmithKline Inc. Product Monograph (PrMEPRON®). [Online]. Dostupno na: <https://ca.gsk.com/media/591391/mepron.pdf> [poslednji pristup 4.2. 2021. godine].
370. \*Rolan P, Mercer A, Weatherley B, Holdich T, Meire H, Peck R, et al. Examination of some factors responsible for a food-induced increase in absorption of atovaquone. *Br J Clin Pharmacol.* 1994;37(1):13-20.
371. \*Rainsford KD. Azapropazone: Springer; 1989.
372. \*Barriere SL. Pharmacology and pharmacokinetics of cefprozil. *Clin Infect Dis.* 1992;14(Supplement 2):S184-S8.
373. \*Owens RC, Nightingale CH, Nicolau DP. Ceftibuten: an overview. *Pharmacotherapy.* 1997;17(4):707-20.
374. \*Welling PG. Pharmacokinetics of the thiazide diuretics. *Biopharm Drug Dispos.* 1986;7(6):501-35.
375. \*Riess W, Dubach U, Burckhardt D, Theobald W, Vuillard P, Zimmerli M. Pharmacokinetic studies with chlorthalidone (Hygroton®) in man. *Eur J Clin Pharmacol.* 1977;12(5):375-82.
376. \*Villikka K, Perttunen K, Rosnell J, Ikvalko H, Vaho H, Pylkknen L. The absolute bioavailability of clodronate from two different oral doses. *Bone.* 2002;31(3):418-21.
377. \*Lebsack M, Nix D, Ryerson B, Toothaker RD, Welage L, Norman AM, et al. Effect of gastric acidity on enoxacin absorption. *Clin Pharmacol Ther.* 1992;52(3):252-6.
378. \*Smith DA. Metabolism, pharmacokinetics and toxicity of functional groups: impact of chemical building blocks on ADMET: Royal Society of Chemistry; 2010.
379. \*AbbVie Inc. TEVETEN® Prescribing information. [Online]. Dostupno na: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2014/020738s029lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/020738s029lbl.pdf) [poslednji pristup 2.2. 2021. godine].

380. \* Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency. Eprosartan-mesilate film-coated tablets. [Online]. Dostupno na: [http://e-lactancia.org/media/papers/Eprosartan-DS\\_MHRA2014.pdf](http://e-lactancia.org/media/papers/Eprosartan-DS_MHRA2014.pdf) [poslednji pristup 30.5.2020.godine].
381. \*Tribut O, Bentué-Ferrer D, Verdier M-C. Suivi thérapeutique pharmacologique du felbamate. *Therapie*. 2010;65(1):35-8.
382. \*Richens A, Banfield C, Salfi M, Nomeir A, Lin C, Jensen P, et al. Single and multiple dose pharmacokinetics of felbamate in the elderly. *Br J Clin Pharmacol*. 1997;44(2):129-34.
383. \*Ross DL, Riley CM. Aqueous solubilities of some variously substituted quinolone antimicrobials. *Int J Pharm*. 1990;63(3):237-50.
384. \*Weidekamm E, Portmann R, Suter K, Partos C, Dell D, Lücker P. Single-and multiple-dose pharmacokinetics of fleroxacin, a trifluorinated quinolone, in humans. *Antimicrob Agents Chemother*. 1987;31(12):1909-14.
385. \*Larregieu CA, Benet LZ. Distinguishing between the permeability relationships with absorption and metabolism to improve BCS and BDDCS predictions in early drug discovery. *Mol Pharm*. 2014;11(4):1335-44.
386. \*Waller ES, Massarella JW, Tomkiw MS, Smith RV, Doluisio JT. Pharmacokinetics of furosemide after three different single oral doses. *Biopharm Drug Dispos*. 1985;6(2):109-17.
387. \*Chen N, Zhou S, Palmisano M. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of lenalidomide. *Clin Pharmacokinet*. 2017;56(2):139-52.
388. \*Kawabata Y, Wada K, Nakatani M, Yamada S, Onoue S. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: basic approaches and practical applications. *Int J Pharm*. 2011;420(1):1-10.
389. \*Femia RA, Goyette RE. The Science of Megestrol Acetate Delivery. *BioDrugs*. 2005;19(3):179-87.
390. \*Jang K, Yoon S, Kim S-E, Cho J-Y, Yoon SH, Lim KS, et al. Novel nanocrystal formulation of megestrol acetate has improved bioavailability compared with the conventional micronized formulation in the fasting state. *Drug Des Devel Ther*. 2014;8:851.
391. \*Wijma RA, Huttner A, Koch BC, Mouton JW, Muller AE. Review of the pharmacokinetic properties of nitrofurantoin and nitroxoline. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(11):2916-26.
392. \* Martínez PMC, Martínez CA, Pinon DL, Marcos P et al. Effect of the Complexation of Ciprofloxacin and Norfloxacin with Cyclodextrin Derivatives on its Dissolution Characteristics. In: Torres Labandeira JJ, Vila-Jato JL, editors. *Proceedings of the Ninth International Symposium on Cyclodextrins*. Dordrecht: Springer; 1999. 433-436.
393. \*Davey P. Overview of drug interactions with the quinolones. *J Antimicrob Chemother*. 1988;22(Supplement\_C):97-107.
394. \*Fonger GC, Hakkinen P, Jordan S, Publicker S. The National Library of Medicine's (NLM) Hazardous Substances Data Bank (HSDB): background, recent enhancements and future plans. *Toxicology*. 2014;325:209-16.
395. \*Josefsson K, Bergan T. Pharmacokinetics of phenoxymethylpenicillin in volunteers. *Chemotherapy*. 1982;28(4):241-6.
396. \*Keith LH, Walters DB. *National toxicology program's chemical solubility compendium*: CRC Press; 1991.
397. \*Li K-j, Chen Q-h, Zhang Z, Zhou P, Li P, Liu J, et al. Determination of phenazopyridine in human plasma by GC—MS and its pharmacokinetics. *J Chromatogr Sci*. 2008;46(8):686-9.
398. \*Boisvert A, Barbeau G, Belanger P. Pharmacokinetics of sulfisoxazole in young and elderly subjects. *Gerontology*. 1984;30(2):125-31.
399. \* Novartis Pharmaceuticals corp. Diovan® tablets, Highlights of prescribing information (Revised 7/2012). [Online]. Dostupno na: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2012/021283s037lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/021283s037lbl.pdf) [posledji pristup 2.2. 2021. godine]
400. \*Smithline HA, Donnino M, Greenblatt DJ. Pharmacokinetics of high-dose oral thiamine hydrochloride in healthy subjects. *BMC clinical pharmacology*. 2012;12(1):4.

401. \*Beermann B, Groschinsky-Grind M. Clinical pharmacokinetics of diuretics. *Clin Pharmacokinet.* 1980;5(3):221-45.
402. Olivera M, Manzo R, Junginger H, Midha K, Shah V, Stavchansky S, et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Ciprofloxacin hydrochloride. *J Pharm Sci.* 2011;100(1):22-33.
403. Larregieu CA, Benet LZ. Drug discovery and regulatory considerations for improving in silico and in vitro predictions that use Caco-2 as a surrogate for human intestinal permeability measurements. *AAPS J.* 2013;15(2):483-97.
404. Dobchev D, Karelson M. Have artificial neural networks met expectations in drug discovery as implemented in QSAR framework? *Expert Opin Drug Discov.* 2016;11(7):627-39.
405. Fagerholm U. Evaluation and suggested improvements of the Biopharmaceutics Classification System (BCS). *J Pharm Pharmacol.* 2007;59(6):751-7.
406. Fairstein M, Swissa R, Dahan A. Regional-dependent intestinal permeability and BCS classification: elucidation of pH-related complexity in rats using pseudoephedrine. *AAPS J.* 2013;15(2):589-97.
407. Cheymol G, Poirier JM, Carrupt PA, Testa B, Weissenburger J, Levron JC, et al. Pharmacokinetics of beta-adrenoceptor blockers in obese and normal volunteers. *Br J Clin Pharmacol.* 1997;43(6):563-70.
408. Wagner JG, Sedman AJ. Quantitation of rate of gastrointestinal and buccal absorption of acidic and basic drugs based on extraction theory. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1973;1(1):23-50.
409. Winne D. Shift of pH-absorption curves. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1977;5(1):53-94.
410. Owen RP, Gray JH, Taylor TR, Carlson EJ, Huang CC, Kawamoto M, et al. Genetic analysis and functional characterization of polymorphisms in the human concentrative nucleoside transporter, CNT2. *Pharmacogenet Genomics.* 2005;15(2):83-90.
411. Hayeshi R, Masimirembwa C, Mukanganyama S, Ungell ALB. Lysosomal trapping of amodiaquine: impact on transport across intestinal epithelia models. *Biopharm Drug Dispos.* 2008;29(6):324-34.
412. Biopharmaceutics Classification System database [Online]. Dostupno na: <http://www.ddfint.org/bcs-database/> [poslednji pristup 30.5.2019.godine].
413. Hansmann S, Darwich A, Margolskee A, Aarons L, Dressman J. Forecasting oral absorption across biopharmaceutics classification system classes with physiologically based pharmacokinetic models. *J Pharm Pharmacol.* 2016;68(12):1501-15.
414. Haslam IS, Wright JA, O'Reilly DA, Sherlock DJ, Coleman T, Simmons NL. Intestinal ciprofloxacin efflux: the role of breast cancer resistance protein (ABCG2). *Drug Metab Dispos.* 2011;39(12):2321-8.
415. Dahan A, Miller JM. The solubility-permeability interplay and its implications in formulation design and development for poorly soluble drugs. 2012; *AAPS J.* 14(2):244-251.
416. Chen M-L, Yu L. The use of drug metabolism for prediction of intestinal permeability. *Mol Pharm.* 2009;6(1):74-81.
417. Hosey CM, Benet LZ. Predicting the extent of metabolism using in vitro permeability rate measurements and in silico permeability rate predictions. *Mol Pharm.* 2015;12(5):1456-66.
418. Rikiya Ohashi RW, Tsuyoshi Esaki, Tomomi Taniguchi, Nao Torimoto-Katori, Tomoko, Watanabe YO, Tsuyoshi Takahashi, Mikiko Tsukimoto, and Kenji Mizuguchi. Development of a Simplified in Vitro P-glycoprotein Substrate Assay and in Silico Prediction Models to Evaluate Transport Potential of P-glycoprotein. *Mol Pharmaceutics.* 2019;16(5):1851-63.
419. Sakiyama YY, H.; Moriya, T.; Hattori, K.; Suzuki, M.; Shimada, K.; Honma, T., et al. Predicting human liver microsomal stability with machine learning techniques. *J Mol Graph Model.* 2008;26(6):907-15.
420. \*Faulkner J, Hayden M, Chasseaud L, Taylor T. Absorption of amlodipine unaffected by food. Solid dose equivalent to solution dose. *Arzneimittel-Forschung.* 1989;39(7):799-801.
421. \*Gengo FM, Brady E. The pharmacokinetics of benazepril relative to other ACE inhibitors. *Clinical cardiology.* 1991;14(S4):44-50.

422. \*Sargentini-Maier ML, Rolan P, Connell J, Tytgat D, Jacobs T, Pigeolet E, et al. The pharmacokinetics, CNS pharmacodynamics and adverse event profile of brivaracetam after single increasing oral doses in healthy males. *Br J Clin Pharmacol.* 2007;63(6):680-8.
423. \*Williams L, Davis JA, Lowenthal DT. The influence of food on the absorption and metabolism of drugs. *Med Clin North Am.* 1993;77(4):815-29.
424. \*Oh DA, Parikh N, Khurana V, Cognata Smith C, Veticaden S. Effect of food on the pharmacokinetics of dronabinol oral solution versus dronabinol capsules in healthy volunteers. *Clin Pharmacol.* 2017;9:9-17.
425. \*Fay MA, Sheth RD, Gidal BE. Oral absorption kinetics of levetiracetam: the effect of mixing with food or enteral nutrition formulas. *Clin Ther.* 2005;27(5):594-8.
426. \*Mojaverian P, Rocci Jr M, Vlasses P, Hoholick C, Clementi R, Ferguson R. Effect of food on the bioavailability of lisinopril, a nonsulfhydryl angiotensin-converting enzyme inhibitor. *J Pharm Sci.* 1986;75(4):395-7.
427. \*Medicines Evaluation Board in the Netherlands. Public assessment report, Imodium Instant smelttablet 2 mg, orodispersible tablets Johnson & Johnson Consumer B.V. [Online]. Dostupno na: <https://www.geneesmiddeleninformatiebank.nl/Pars/h33724.pdf> [poslednji pristup 30.5.2020.godine].
428. \*Sambol N, Brookes L, Chiang J, Goodman A, Lin E, Liu C, et al. Food intake and dosage level, but not tablet vs solution dosage form, affect the absorption of metformin HCl in man. *Br J Clin Pharmacol.* 1996;42(4):510-2.
429. \*Delchier J, Guerret M, Vidon N, Dubray C, Lavene D. Influence of digestive secretions and food on intestinal absorption of nicardipine. *Eur J Clin Pharmacol.* 1988;34(2):165-71.
430. \*Knadler MP, Bergstrom RF, Callaghan JT, Obermeyer BD, Rubin A. Absorption studies of the H2-blocker nizatidine. *Clin Pharmacol Ther.* 1987;42(5):514-20.
431. \*Roberts C. Clinical pharmacokinetics of ranitidine. *Clin Pharmacokinet.* 1984;9(3):211-21.
432. \*Derendorf H, Hochhaus G. Handbook of pharmacokinetic/pharmacodynamic correlation. Boca Raton: CRC Press; 1995.
433. \*Culebras A, Borja J, Garcia-Rafanell J. Triflusal versus Aspirin for the Prevention of Stroke. In: Cummings JL, editor. *Progress in Neurotherapeutics and Neuropsychopharmacology.* New York: Cambridge University Press; 2008.13-33.
434. \*Ellis PP, Price PK, Kelmenson R, Rendi MA. Effectiveness of generic acetazolamide. *Arch Ophthalmol.* 1982;100(12):1920-2.
435. \*Jang Y-J, Jeong TC, Noh K, Baek I-W, Kwon K-i, Kim E, et al. Prandial effect on the systemic exposure of amisulpride. *Arch Pharm Res.* 2014;37(10):1325-8.
436. \*Barbhैया R, Shukla U, Gleason C, Shyu W, Pittman K. Comparison of the effects of food on the pharmacokinetics of cefprozil and cefaclor. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34(6):1210-3.
437. \*Dudkowski C, Karim A, Munsaka M. Effects of Food Intake on the Pharmacokinetics of Azilsartan Medoxomil and Chlorthalidone Alone and in Fixed-Dose Combination in Healthy Adults. *Clin Pharmacol Drug Dev.* 2016;5(5):393-8.
438. \*Laitinen K, Patronen A, Harju P, Löyttyniemi E, Pylkkänen L, Kleimola T, et al. Timing of food intake has a marked effect on the bioavailability of clodronate. *Bone.* 2000;27(2):293-6.
439. \*Somogyi A, Bochner F, Keal J, Rolan P, Smith M. Effect of food on enoxacin absorption. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987;31(4):638-9.
440. \*Burton ME. *Applied pharmacokinetics & pharmacodynamics: principles of therapeutic drug monitoring.* Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
441. \*Piscitelli SC, Rodvold KA, Pai MP. *Drug interactions in infectious diseases.* Dordrecht: Springer; 2011
442. \*Welling PG. Effects of food on drug absorption. *Annu Rev Nutr.* 1996;16(1):383-415.
443. \*Gaines KK. Phenazopyridine hydrochloride: the use and abuse of an old standby for UTI. *Urol Nurs.* 2004;24(3):207.
444. \*Csáky TZ. *Pharmacology of intestinal permeation II.* Berlin: Springer; 1984.

445. \*De Gasparo, M. "AT 1 receptor antagonists: pharmacology." *Angiotensin Vol. II*. Berlin: Springer; 2004. 417-451.
446. \*Levy G, Jusko WJ. Factors affecting the absorption of riboflavin in man. *J Pharm Sci*. 1966;55(3):285-9.
447. \*Bezchlibnyk-Butler K, Aleksic I, Kennedy SH. Citalopram--a review of pharmacological and clinical effects. *J Psychiatry Neurosci*. 2000;25(3):241.
448. \*Gupta S, Banfield C, Affrime M, Marbury T, Padhi D, Glue P. Oral bioavailability of desloratadine is unaffected by food. *Clin Pharmacokinet*. 2002;41(1):7-12.
449. \*Seltzer B. Donepezil: a review. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2005;1(3):527-36.
450. \*Colucci P, Yue CS, Ducharme M, Benvenga S. A review of the pharmacokinetics of levothyroxine for the treatment of hypothyroidism. *Eur Endocrinol*. 2013;9(1):40.
451. \*Singh BN. Effects of food on clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet*. 1999;37(3):213-55.
452. \*Love RC, Nelson MW. Pharmacology and clinical experience with risperidone. *Expert Opin Pharmacother*. 2000;1(7):1441-53.
453. \*Riddell J. Bioavailability of candesartan is unaffected by food in healthy volunteers administered candesartan cilexetil. *J Hum Hypertens*. 1997;11:S29-30.
454. \*Tenero D, Martin D, Ilson B, Jushchyshyn J, Boike S, Lundberg D, et al. Pharmacokinetics of intravenously and orally administered eprosartan in healthy males: absolute bioavailability and effect of food. *Biopharm Drug Dispos*. 1998;19(6):351-6.
455. \*Palmer KJ, McTavish D. Felbamate. *Drugs*. 1993;45(6):1041-65.
456. \*McCrinkle J, Li Kam Wa T, Barron W, Prescott L. Effect of food on the absorption of frusemide and bumetanide in man. *Br J Clin Pharmacol*. 1996;42(6):743-6.
457. \*Li Y, Song CK, Kim M-K, Lim H, Shen Q, Lee DH, et al. Nanomemulsion of megestrol acetate for improved oral bioavailability and reduced food effect. *Arch Pharm Res*. 2015;38(10):1850-6.
458. Custodio JM, Wu C-Y, Benet LZ. Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008;60(6):717-33.
459. Carver PL, Fleisher D, Zhou SY, Kaul D, Kazanjian P, Li C. Meal composition effects on the oral bioavailability of indinavir in HIV-infected patients. *Pharm Res*. 1999;16(5):718-24.
460. Pabla D, Akhlaghi F, Zia H. Intestinal permeability enhancement of levothyroxine sodium by straight chain fatty acids studied in MDCK epithelial cell line. *Eur J Pharm Sci*. 2010;40(5):466-72.
461. Liedholm H, Melander A. Concomitant food intake can increase the bioavailability of propranolol by transient inhibition of its presystemic primary conjugation. *Clin Pharmacol Ther*. 1986;40(1):29-36.
462. Melander A, Danielson K, Schersten B, Wåhlin E. Enhancement of the bioavailability of propranolol and metoprolol by food. *Clin Pharmacol Ther*. 1977;22(1):108-12.
463. Beermann B, Groschinsky-Grind, M. Gastrointestinal absorption of hydrochlorothiazide enhanced by concomitant intake of food. *Eur J Clin Pharmacol*. 13(2):125-8.
464. Barbhuiya RH, Craig WA, Corrick-West HP, Welling PG. Pharmacokinetics of hydrochlorothiazide in fasted and nonfasted subjects: a comparison of plasma level and urinary excretion methods. *J Pharm Sci*. 1982;71(2):245-8.
465. \*Meng X, Mojaverian P, Doedée M, Lin E, Weinryb I, Chiang ST, et al. Bioavailability of amiodarone tablets administered with and without food in healthy subjects. *Am J Cardiol*. 2001;87(4):432-5.
466. \*Eshelman FN, Spyker DA. Pharmacokinetics of amoxicillin and ampicillin: crossover study of the effect of food. *Antimicrob Agents Chemother*. 1978;14(4):539-43.
467. \*Welling PG, Tse F. Food interactions affecting the absorption of analgesic and anti-inflammatory agents. *Drug Nutr Interact*. 1983;2(3):153-68.

468. \*Melander A, Stenberg P, Liedholm H, Schersten B, Wåhlin-Boll E. Food-induced reduction in bioavailability of atenolol. *Eur J Clin Pharmacol.* 1979;16(5):327-30.
469. \*Mozayani A, Raymon L. *Handbook of drug interactions: a clinical and forensic guide.* Totowa, NJ: Springer Science & Business Media; 2011.
470. \*Gower P, Dash C. Cephalexin: human studies of absorption and excretion of a new cephalosporin antibiotic. *Br J Pharmacol.* 1969;37(3):738.
471. \*Desmond P, Harman P, Gannoulis N, Kamm M, Mashford M. The effect of an antacid and food on the absorption of cimetidine and ranitidine. *J Pharm Pharmacol.* 1990;42(5):352-4.
472. \*Swanson B, Vlasses P, Ferguson R, Bergquist P, Till A, Irvin J, et al. Influence of food on the bioavailability of enalapril. *J Pharm Sci.* 1984;73(11):1655-7.
473. \*Smith H, Jokubaitis L, Troendle A, Hwang D, Robinson W. Pharmacokinetics of fluvastatin and specific drug interactions. *Am J Hypertens.* 1993;6(11\_Pt\_2):375S-82S.
474. \*Colburn WA, Gibson D, Wiens R, Hanigan J. Food increases the bioavailability of isotretinoin. *J Clin Pharmacol.* 1983;23(11):534-9.
475. \*Bannwarth B, Lapique F, Netter P, Monot C, Tamisier J, Thomas P, et al. The effect of food on the systemic availability of ketoprofen. *Eur J Clin Pharmacol.* 1988;33(6):643-5.
476. \*Palazzini E, Cristofori M, Babbini M. Bioavailability of a new controlled-release oral naproxen formulation given with and without food. *Int J Clin Pharmacol Res.* 1992;12(4):179-84.
477. \*John V, Smith S. Influence of food intake on plasma oxprenolol concentrations following oral administration of conventional and Oros preparations. *Br J Clin Pharmacol.* 1985;19(S2):191S-5S.
478. \*Forrest JA, Clements J, Prescott L. Clinical pharmacokinetics of paracetamol. *Clin Pharmacokinet.* 1982;7(2):93-107.
479. \*Ishizaki T, Nomura T, Abe T. Pharmacokinetics of piroxicam, a new nonsteroidal anti-inflammatory agent, under fasting and postprandial states in man. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1979;7(4):369-81.
480. \*Conway EL, Phillips PA, Drummer OH, Louis WJ. Influence of food on the bioavailability of a sustained-release verapamil preparation. *J Pharm Sci.* 1990;79(3):228-31.
481. \*Sun Q, Sever P. Amiloride: A review. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2020;21(4):1470320320975893-.
482. \*Verbeeck R-K, Junginger H, Midha K, Shah V, Barends D. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms based on biopharmaceutics classification system (BCS) literature data: Chloroquine phosphate, chloroquine sulfate, and chloroquine hydrochloride. *J Pharm Sci.* 2005;94(7):1389-95.
483. \*Chuasuwana B, Binjesoh V, Polli J, Zhang H, Amidon G, Junginger H, et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Diclofenac sodium and diclofenac potassium. *J Pharm Sci.* 2009;98(4):1206-19.
484. \*Koeppel MO, Cristofolletti R, Fernandes EF, Storpirtis S, Junginger HE, Kopp S, et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Levofloxacin. *J Pharm Sci.* 2011;100(5):1628-36.
485. \*Silva AL, Cristofolletti R, Storpirtis S, Sousa VD, Junginger HE, Shah VP, et al. Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: Stavudine. *J Pharm Sci.* 2012;101(1):10-6.
486. \*Melander A, McLean A. Influence of Food Intake on Presystemic Clearance of Drugs. *Clin Pharmacokinet.* 1983;8(4):286-96.
487. \*Rediguieri CF, Porta V, Nunes DS, Nunes TM, Junginger HE, Kopp S, et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: metronidazole. *J Pharm Sci.* 2011;100(5):1618-27.
488. \*Vogt M, Derendorf H, Krämer J, Junginger HE, Midha KK, Shah VP, et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: prednisone. *J Pharm Sci.* 2007;96(6):1480-9.

489. \*Vergin H, Fisch U, Mahr G, Winterhalter B. Analysis of formulation and food effect on the absorption of metoclopramide. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2002;40(4):169-74.
490. \*Strauch S, Jantratid E, Dressman J, Junginger H, Kopp S, Midha K, et al. Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Lamivudine. *J Pharm Sci.* 2011;100(6):2054-63.
491. \*Grube S, Langguth P, Junginger H, Kopp S, Midha K, Shah V, et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Quinidine sulfate. *J Pharm Sci.* 2009;98(7):2238-51.
492. \*Levine M, Walker S, Paton T. The effect of food or sucralfate on the bioavailability of S (+) and R (-) enantiomers of ibuprofen. *J Clin Pharmacol.* 1992;32(12):1110-4.
493. \*Soares KC, Rediguieri CF, Souza J, Serra CHR, Abrahamsson B, Groot D, et al. Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: Zidovudine (azidothymidine). *J Pharm Sci.* 2013;102(8):2409-23.
494. \*Peloquin CA, Namdar R, Dodge A, Nix D. Pharmacokinetics of isoniazid under fasting conditions, with food, and with antacids. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1999;3(8):703-10.
495. \*Gajendran J, Krämer J, Shah VP, Langguth P, Polli J, Mehta M, et al. Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: nifedipine. *J Pharm Sci.* 2015;104(10):3289-98.
496. \*Vogt M, Derendorf H, Krämer J, Junginger H, Midha K, Shah V, et al. Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Prednisolone. *J Pharm Sci.* 2007;96(1):27-37.
497. \*Dörwald FZ. Lead optimization for medicinal chemists: pharmacokinetic properties of functional groups and organic compounds: John Wiley & Sons; 2012.
498. Ghadi R, Dand N. BCS class IV drugs: Highly notorious candidates for formulation development. *J Control Release.* 2017;248:71-95.
499. Markovic M, Zur M, Ragatsky I, Cvijić S, Dahan A. BCS Class IV Oral Drugs and Absorption Windows: Regional-Dependent Intestinal Permeability of Furosemide. *Pharmaceutics.* 2020;12(12):1175.
500. Wang Y, Tan X, Fan X, Zhao L, Wang S, He H, et al. Current strategies for oral delivery of BCS IV drug nanocrystals: challenges, solutions and future trends. *Expert Opin Drug Deliv.* 2021:1-18.
501. GlaxoSmithKline. ZOVIRAX® (acyclovir) Prescribing information. [Online]. Dostupno na: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2005/018828s030,020089s019,019909s0201bl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2005/018828s030,020089s019,019909s0201bl.pdf) [poslednji pristup 30.5.2020.godine].
502. Kristl A, Srčić S, Vrečer F, Vojnovic D. Polymorphism and pseudopolymorphism: influencing the dissolution properties of the guanine derivative acyclovir. *Int J Pharm.* 1996;139(1-2):231-5.
503. Ates M, Kaynak MS, Sahin S. Effect of permeability enhancers on paracellular permeability of acyclovir. *J Pharm Pharmacol.* 2016;68(6):781-90.
504. Arnal J, Gonzalez-Alvarez I, Bermejo M, Amidon G, Junginger H, Kopp S, et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Aciclovir. *J Pharm Sci.* 2008;97(12):5061-73.
505. De Miranda P, Whitley R, Blum M, Keeney R, Barton N, Cocchetto D, et al. Acyclovir kinetics after intravenous infusion. *Clin Pharmacol Ther.* 1979;26(6):718-28.
506. Laskin O, De Miranda P, King D, Page D, Longstreth J, Rocco L, et al. Effects of probenecid on the pharmacokinetics and elimination of acyclovir in humans. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982;21(5):804-7.
507. Kubbinga M, Nguyen MA, Staubach P, Teerenstra S, Langguth P. The influence of chitosan on the oral bioavailability of acyclovir—a comparative bioavailability study in humans. *Pharm Res.* 2015;32(7):2241-9.

508. Al-Yamani M, Al-Khamis K, El-Sayed Y, Bawazir S, Al-Rashood K, Gouda M. Comparative bioavailability of two tablet formulations of acyclovir in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 1998;36(4):222-6.
509. Palma-Aguirre JA, Absalón-Reyes JA, Novoa-Heckel G, de Lago A, Oliva I, Rodríguez Z, et al. Bioavailability of two oral suspension and two oral tablet formulations of acyclovir 400 mg: Two single-dose, open-label, randomized, two-period crossover comparisons in healthy Mexican adult subjects. *Clin Ther.* 2007;29(6):1146-52.
510. Susantakumar P, Gaur A, Sharma P. Comparative pharmacokinetics, safety and tolerability evaluation of acyclovir ir 800 mg tablet in healthy Indian adult volunteers under fasting and non-fasting conditions. *J Bioequiv Availab.* 2011;3(6):128-38.
511. Cho C-H, Kim J-Y, Park E-S. Systematic approach to elucidate compaction behavior of acyclovir using a compaction simulator. *Int J Pharm.* 2019:118904.
512. De Miranda P, Good SS, Krasny HC, Connor JD, Laskin OL, Lietman PS. Metabolic fate of radioactive acyclovir in humans. *Am J Med.* 1982;73(1):215-20.
513. Park M-H, Shin S-H, Byeon J-J, Lee G-H, Yu B-Y, Shin YG. Prediction of pharmacokinetics and drug-drug interaction potential using physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling approach: A case study of caffeine and ciprofloxacin. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2017;21(1):107-15.
514. Dhaliwal S, Jain S, Singh HP, Tiwary A. Mucoadhesive microspheres for gastroretentive delivery of acyclovir: in vitro and in vivo evaluation. *AAPS J.* 2008;10(2):322.
515. Wilson CG, Washington N, Hardy JG, Bond SW. The influence of food on the absorption of acyclovir: a pharmacokinetic and scintigraphic assessment. *Int J Pharm.* 1987;38(1-3):221-5.
516. Orita Y, Ando A, Urakabe S, Abe H. A metal complexing property of furosemide and bumetanide: determination of pK and stability constant. *Arzneimittel-Forschung.* 1976;26(1):11-3.
517. Avdeef A, Berger CM, Brownell C. pH-metric solubility. 2: correlation between the acid-base titration and the saturation shake-flask solubility-pH methods. *Pharm Res.* 2000;17(1):85-9.
518. Sutcliffe, F., Riley, S., Kaser-Liard, B., Turnberg, L., Rowland, M., 1988. Absorption of drugs from human jejunum and ileum. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1988; 26: 206P–207P
519. Hammarlund M, Paalzow L, Odland B. Pharmacokinetics of furosemide in man after intravenous and oral administration. Application of moment analysis. *Eur J Clin Pharmacol.* 1984;26(2):197-207.
520. Michael RK, Ralph EC, Arden WF, Barbara MK. Pharmacokinetics of orally administered furosemide. *Clin Pharmacol Ther.* 1974;15(2):178-86.
521. Waller ES, Hamilton SF, Massarella JW, Sharanevych MA, Smith RV, Yakatan GJ, et al. Disposition and absolute bioavailability of furosemide in healthy males. *J Pharm Sci.* 1982;71(10):1105-8.
522. Beermann B, Midskov C. Reduced bioavailability and effect of furosemide given with food. *Eur J Clin Pharmacol.* 1986;29(6):725-7.
523. Benet LZ. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of furosemide in man: a review. *J Pharmacokinetic Biopharm.* 1979;7(1):1-27.
524. Shebley M, Sandhu P, Emami Riedmaier A, Jamei M, Narayanan R, Patel A, et al. Physiologically Based Pharmacokinetic Model Qualification and Reporting Procedures for Regulatory Submissions: A Consortium Perspective. *Clinical pharmacology and therapeutics.* 2018;104(1):88-110.
525. Van Den Abeele J, Brouwers J, Mattheus R, Tack J, Augustijns P. Gastrointestinal behavior of weakly acidic BCS class II drugs in man—case study of diclofenac potassium. *J Pharm Sci.* 2016;105(2):687-96.
526. Clear NJ, Milton A, Humphrey M, Henry BT, Wulff M, Nichols DJ, et al. Evaluation of the Intelisite capsule to deliver theophylline and frusemide tablets to the small intestine and colon. *Eur J Pharm Sci.* 2001;13(4):375-84.
527. Flesch G, Müller P, Lloyd P. Absolute bioavailability and pharmacokinetics of valsartan, an angiotensin II receptor antagonist, in man. *Eur J Clin Pharmacol.* 1997;52(2):115-20.



528. Nekkanti V, Wang Z, Betageri GV. Pharmacokinetic evaluation of improved oral bioavailability of valsartan: proliposomes versus self-nanoemulsifying drug delivery system. *AAPS PharmSciTech*. 2016;17(4):851-62.
529. Chella N, Tadikonda R. Melt dispersion granules: formulation and evaluation to improve oral delivery of poorly soluble drugs—a case study with valsartan. *Drug Dev Ind Pharm*. 2015;41(6):888-97.
530. Schölkens BA. *Angiotensin Vol. II*: Springer Science & Business Media; 2004.
531. Novartis Pharmaceuticals corp. Diovan® tablets, Highlights of prescribing information (Revised 12/2011). [Online]. Dostupno na: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2011/021283s033lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/021283s033lbl.pdf) [posledji prisup 16.9. 2020. godine]
532. Hamed R, Alnadi SH. Transfer behavior of the weakly acidic BCS class II drug valsartan from the stomach to the small intestine during fasted and fed states. *AAPS PharmSciTech*. 2018;19(5):2213-25.
533. Wu Q, Wang X, Chen Q, Zou Y, Xu X, Li T, et al. Pharmacokinetics and Bioequivalence of Two Formulations of Valsartan 80 mg Capsules: A Randomized, Single Dose, 4-Period Crossover Study in Healthy Chinese Volunteers Under Fasting and Fed Conditions. *Drug Des Devel Ther*. 2020;14:4221.
534. Zaid AN, Cortesi R, Qaddomi A, Khammash S. Formulation and bioequivalence of two valsartan tablets after a single oral administration. *Sci Pharm*. 2011;79(1):123-36.
535. Müller P, Flesch G, de Gasparo M, Gasparini M, Howald H. Pharmacokinetics and pharmacodynamic effects of the angiotensin II antagonist valsartan at steady state in healthy, normotensive subjects. *Eur J Clin Pharmacol*. 1997;52(6):441-9.
536. Yang B, Wu C, Ji B, Ai X, Kuang X, Wu M, et al. The biorelevant concentration of Tween 80 solution is a simple alternative medium to simulated fasted state intestinal fluid. *RSC advances*. 2015;5(127):104846-53.
537. Balakrishnan A, Rege BD, Amidon GL, Polli JE. Surfactant-mediated dissolution: contributions of solubility enhancement and relatively low micelle diffusivity. *J Pharm Sci*. 2004;93(8):2064-75.
538. Thomas M, Johnston C. Valsartan. *J Drug Eval*. 2004;2(3):67-101.
539. Sioufi A, Marfil F, Jaouen A, Cardot JM, Godbillon J, Ezzet F, et al. The effect of age on the pharmacokinetics of valsartan. *Biopharm Drug Dispos*. 1998;19(4):237-44.
540. Yamashiro W, Maeda K, Hirouchi M, Adachi Y, Hu Z, Sugiyama Y. Involvement of transporters in the hepatic uptake and biliary excretion of valsartan, a selective antagonist of the angiotensin II AT1-receptor, in humans. *Drug Metab Dispos*. 2006;34(7):1247-54.
541. Nekkanti V, Venkatesan N, Wang Z, Betageri GV. Improved oral bioavailability of valsartan using proliposomes: design, characterization and in vivo pharmacokinetics. *Drug Dev Ind Pharm*. 2015;41(12):2077-88.
542. Poirier A, Cascais A-C, Funk C, Lavé T. Prediction of pharmacokinetic profile of valsartan in human based on in vitro uptake transport data. *J Pharmacokinetic Pharmacodyn*. 2009;36(6):585.
543. Prasad P, Mangat S, Choi L, Chen S, Chen B, Bernardo A, et al. Effect of renal function on the pharmacokinetics of valsartan. *Clinical drug investigation*. 1997;13(4):207-14.
544. Novartis Pharmaceuticals Canada Inc. Diovan® tablets, Product monograph (Revised 5/2015).[Online].[http://www.ask.novartispharma.ca/download.htm?res=diovan\\_scrip\\_e.pdf&resTitleId=725](http://www.ask.novartispharma.ca/download.htm?res=diovan_scrip_e.pdf&resTitleId=725) [posledji prisup 16.9. 2020. godine]
545. Xiao J, Tran D, Zhang X, Zhang T, Seo S, Zhu H, et al. Biliary Excretion–Mediated Food Effects and Prediction. *AAPS J*. 2020;22(6):124.
546. Takács-Novák K, Noszál B, Hermecz I, Keresztúri G, Podányi B, Szasz G. Protonation equilibria of quinolone antibacterials. *J Pharm Sci*. 1990;79(11):1023-8.
547. Ahumada AA, Seeck J, Allemandi D, Manzo R. The pH/solubility profile of norfloxacin. *STP pharma sciences*. 1993;3:250-3.

548. Völgyi G, Vizserálek G, Takács-Novák K, Avdeef A, Tam KY. Predicting the exposure and antibacterial activity of fluoroquinolones based on physicochemical properties. *Eur J Pharm Sci.* 2012;47(1):21-7.
549. Kłosińska-Szmurło E, Pluciński F, Grudzień M, Betlejewska-Kielak K, Biernacka J, Mazurek A. Experimental and theoretical studies on the molecular properties of ciprofloxacin, norfloxacin, pefloxacin, sparfloxacin, and gatifloxacin in determining bioavailability. *J Biol Phys.* 2014;40(4):335-45.
550. Bermejo M, Avdeef A, Ruiz A, Nalda R, Ruell JA, Tsinman O, et al. PAMPA—a drug absorption in vitro model: 7. Comparing rat in situ, Caco-2, and PAMPA permeability of fluoroquinolones. *Eur J Pharm Sci.* 2004;21(4):429-41.
551. Das I, Halder M. Counterpointing Scenarios on the Fate of Different Prototropic Forms of Norfloxacin Housed in the Pocket of Lysozyme: The Nonelectrostatic Interactions in the Protein Interior Are in the Controlling Role on the Prototropic Equilibria of the Guest. *ACS omega.* 2017;2(9):5504-17.
552. Breda SA, Jimenez-Kairuz AF, Manzo RH, Olivera ME. Solubility behavior and biopharmaceutical classification of novel high-solubility ciprofloxacin and norfloxacin pharmaceutical derivatives. *Int J Pharm.* 2009;371(1-2):106-13.
553. Sörgel F, Jaehde U, Naber K, Stephan U. Pharmacokinetic disposition of quinolones in human body fluids and tissues. *Clin Pharmacokinet.* 1989;16(1):5-24.
554. Kivistö K, Ojala-Karlsson P, Neuvonen PJ. Inhibition of norfloxacin absorption by dairy products. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992;36(2):489-91.
555. Edlund C, Bergan T, Josefsson K, Solberg R, Nord CE. Effect of norfloxacin on human oropharyngeal and colonic microflora and multiple-dose pharmacokinetics. *Scand J Infect Dis.* 1987;19(1):113-21.
556. Eandi M, Viano I, Di Nola F, Leone L, Genazzani E. Pharmacokinetics of norfloxacin in healthy volunteers and patients with renal and hepatic damage. *Eur J Clin Microbiol.* 1983;2(3):253-9.
557. Al-rashood KA, Al-khamis KI, El-sayed YM, Al-bella S, Al-yamani MA, Alam SM, et al. Bioequivalence evaluation of norfloxacin 400 mg tablets (Uroxin® and Noroxin®) in healthy human volunteers. *Biopharm Drug Dispos.* 2000;21(5):175-9.
558. Guo Y, Mishra MK, Wang C, Sun CC. Crystallographic and Energetic Insights into Reduced Dissolution and Physical Stability of a Drug–Surfactant Salt: The Case of Norfloxacin Lauryl Sulfate. *Mol Pharm.* 2019;17(2):579-87.
559. Hooper DC, Wolfson JS. The fluoroquinolones: pharmacology, clinical uses, and toxicities in humans. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985;28(5):716-21.
560. Kamiya Y, Otsuka S, Miura T, Yoshizawa M, Nakano A, Iwasaki M, et al. Physiologically Based Pharmacokinetic Models Predicting Renal and Hepatic Concentrations of Industrial Chemicals after Virtual Oral Doses in Rats. *Chem Res Toxicol.* 2020.
561. Swanson BN, Boppana VK, Vlasses PH, Rotmensch HH, Ferguson R. Norfloxacin disposition after sequentially increasing oral doses. *Antimicrob Agents Chemother.* 1983;23(2):284-8.
562. Drusano G, Labro M-T, Cars O, Mendes P, Shah P, Sörgel F, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones. *Clin Microbiol Infect.* 1998;4:2S27-2S41.
563. Deppermann K-M, Lode H. Fluoroquinolones: interaction profile during enteral absorption. *Drugs.* 1993;45(3):65-72.
564. Frost RW, Carlson JD, Dietz AJ, Jr., Heyd A, Lettieri JT. Ciprofloxacin pharmacokinetics after a standard or high-fat/high-calcium breakfast. *J Clin Pharmacol.* 1989;29(10):953-5.

## **PRILOG 1. Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo doktorske disertacije**

### **Radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21):**

**Gatarić B**, Parojčić J. An investigation into the factors governing drug absorption and food effect prediction based on data mining methodology. AAPS J. 2019;22(1):11.

### **Radovi objavljeni u međunarodnim časopisima (M23):**

**Gatarić B**, Parojčić J. Application of data mining approach to identify drug subclasses based on solubility and permeability. Biopharm Drug Dispos. 2019; 40(2): 51-61.

### **Radovi saopšteni na međunarodnim naučnim skupovima štampani u izvodu (M34)**

**Gatarić B**, Parojčić J. Application of cluster analysis to identify drug subclasses based on dose number and permeability. 11th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, 22-24.9.2016. Belgrade, Serbia, Book of Proceedings.p. 153-154

**Gatarić B**, Parojčić J. Data mining of physicochemical, biopharmaceutical and pharmacokinetic properties of model drugs exhibiting low solubility and low permeability. 12th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology 20-22.9.2018. Szeged, Hungary, Book of Abstracts.p.192-193



## **PRILOG 2. Biografija**

Biljana Gatarić je rođena 03.08.1988. godine u Banjaluci. Osnovnu školu je završila u Laktašima, a Gimnaziju u Banjaluci. Studije farmacije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Banjaluci je upisala 2007. godine. Bila je stipendista Ministarstva prosvjete i kulture Republike Srpske i dobitnik je prestižne stipendije „Fond dr Milan Jelić“ koja se dodeljuje izvanrednim studentima. Diplomirala je 2012. godine sa prosečnom ocenom 9,39.

Pripravnički staž u trajanju od 9 meseci je obavila u apoteci, nakon čega je položila stručni ispit i stekla licencu za obavljanje delatnosti magistra farmacije. Od 2015. godine je zaposlena u zvanju višeg asistenta na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Medicinskog fakulteta u Banjaluci gde učestvuje u izvođenju teorijske nastave i laboratorijskih vežbi, kao i u naučno-istraživačkom radu sa studentima. Akademske doktorske studije, modul Farmaceutska tehnologija, na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu je upisala 2014.godine.

Autor je jednog rada objavljenog u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), jednog rada objavljenog u međunarodnom časopisu (M23), jednog rada objavljena u istaknutom nacionalnom časopisu (M52), jednog rada u nacionalnom časopisu prve kategorije u Republici Srpskoj, tri saopštenja na međunarodnim skupovima štampanih u celini (M33) i sedam saopštenja na međunarodnim skupovima štampanih u izvodu (M34).



## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Биљана Гатарић

Број индекса 15/14

### Изјављујем

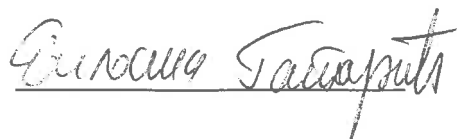
да је докторска дисертација под насловом

Примена техника за напредну анализу података у биофармацеутској карактеризацији лекова: идентификација, класификација и предвиђање фактора који утичу на интестиналну апсорпцију лековитих супстанци

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 09.09.2021. год.







## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Биљана Гатарић

Број индекса 15/14

Студијски програм Фармацеутска технологија  
Примена техника за напредну анализу података у биофармацеутској карактеризацији  
Наслов рада лекова: идентификација, класификација и предвиђање фактора који утичу на  
интестиналну апсорпцију лековитих супстанци

Ментор проф др. Јелена Паројчић

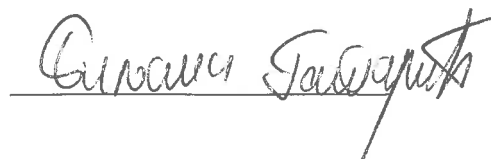
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 09.09.2021.год.





## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Примена техника за напредну анализу података у биофармацеутској карактеризацији лекова: идентификација, класификација и предвиђање фактора који утичу на интестиналну апсорпцију лековитих супстанци

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 09.09.2021.год.





1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.