

**UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET**



**Aleksandra A. Petrović**

**PRIMENA KONCEPTA DIZAJNA KVALITETA U  
RANOJ FAZI FARMACEUTSKOG RAZVOJA  
TABLETA SA MODIFIKOVANIM  
OSLOBADANJEM AKTIVNE SUPSTANCE**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2013**

**UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF PHARMACY**



**Aleksandra A. Petrović**

**APPLICATION OF QUALITY BY DESIGN  
CONCEPT IN THE EARLY STAGE OF  
PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT FOR  
TABLETS WITH MODIFIED RELEASE OF THE  
ACTIVE SUBSTANCE**

**Doctoral Dissertation**

**Belgrade, 2013**

**MENTOR:**

dr sci Zorica Đurić, redovni profesor ,  
Univerzitet u Beogradu  
Farmaceutski fakultet

**ČLANOVI KOMISIJE:**

dr sci Svetlana Ibrić, vanredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu  
Farmaceutski fakultet, Beograd

dr sci Slavica Ristić, naučni saradnik,  
Institut  
Galenika a.d., Beograd

*Ovaj rad je urađen na Katedri za farmaceutsku tehnologiju Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta pod rukovodstvom Prof dr Zorice Đurić. Eksperimentalni deo ovog rada urađen je u Institutu za istraživanje i razvoj Galenike a.d.*

*Želim da se najiskrenije zahvalim svom mentoru, Prof dr Zorici Đurić, na pomoći i podršci u svim fazama izrade ovog rada.*

*Posebno se zahvaljujem Prof dr Svetlani Ibrić na velikoj podršci, dragocenim savetima i pomoći u toku izrade ovog rada.*

*Veliku zahvalnost na stručnoj pomoći i podršci u toku izrade i pisanja rada dugujem dr Slavici Ristić.*

*Posebno želim da se zahvalim dr Saši Petričeviću, jer bez njegove pomoći deo rada koji se odnosi na realizaciju IVIVR ispitivanja ne bi bio moguć.*

*Zahvaljujem se saradnicima i tehničarima Laboratorije za čvrste oblike i Službe za analitiku i stabilnost, na pomoći u realizaciji eksperimentalnog rada vezanog za razvoj formulacije i in vitro ispitivanja.*

**PRIMENA KONCEPTA DIZAJNA KVALITETA U RANOJ FAZI  
FARMACEUTSKOG RAZVOJA TABLETA SA MODIFIKOVANIM  
OSLOBAĐANJEM AKTIVNE SUPSTANCE**

*Rezime*

Istraživanja obuhvaćena ovim radom podrazumevala su primenu koncepta dizajna kvaliteta u ranoj fazi farmaceutskog razvoja novog proizvoda, kod izrade aminofilin tableta sa modifikovanim oslobađanjem teofilina. Primenjene su alatke i metode preporučene novim FDA i EMA smernicama (analiza rizika, planiranje eksperimenta, Biofarmaceutski sistem klasifikacije, *in vitro* ispitivanja, provera mogućnosti uspostavljanja *in vitro/in vivo* odnosa).

Cilj rada je podrazumevao: definisanje preliminarnog *in vitro* testa ispitivanja brzine rastvaranja aminofilin tableta sa modifikovanim oslobađanjem teofilina obzirom da se ne raspolaze oficinalnom metodom; razvoj optimalne formulacije na bazi bubrećih matriks formirajućih polimera (Methocel® K100M i Carbopol 971P NF) različite hemijske strukture, načina izgradnje matriksa i mehanizma oslobađanja aktivne supstance; definisanje ciljanog profila kvaliteta proizvoda (*Quality Target Product Profile*, engl., QTPP), kritičnih atributa kvaliteta (*Critical Quality Attribute*, engl., CQA) gotovog proizvoda, materijala i formulacionih komponenata; izbor prototip formulacije prihvatljivog profila oslobađanja; provera mogućnosti uspostavljanja *in vitro/in vivo* odnosa za odabrane formulacije; predvidivost odabrane *in vitro* metode da opiše ponašanje preparata *in vivo*; procenu mogućnosti primene kunića kao životinjskog modela za *in vivo* ispitivanja u ranoj fazi istraživanja.

Primenjena metodologija je podrazumevala: upotrebu četiri USP 30 testa (Test 1 USP, Test 3 USP, Test 6 USP, Test 9 USP oficinalna u okviru monografije za teofilin kapsule sa produženim oslobađanjem) i metode poluizmene (prema preporukama Ph Eur 6.0), u okviru *in vitro* ispitivanja; korišćenje različitih modela dizajna eksperimenta punog faktorijalnog dizajna, dizajna smeše, generalnog jednofaktorskog dizajna; korišćenje model–nezavisnih metoda (faktor razlika  $f_1$ , faktor sličnosti  $f_2$ ) i model-zavisnih metoda (model kinetike nultog reda, Higuchi model kvadratnog korena i Korsmayer - Peppas-ov model) za analizu brzine i mehanizma oslobađanja lekovite supstance iz tableta.

U okviru *in vivo* ispitivanja, korišćena je metoda izračunavanja relativne biološke raspoloživosti  $F_{rel}\%$  među formulacijama, Wagner-Nelson metoda za određivanja

procenta kumulativne frakcije (%FD) teofilina, inverzna Wagner-Nelson metoda za dobijanje pretpostavljenog *in vivo* profila oslobađanja i linearna regresiona analiza za procenu korelativnosti *in vitro/in vivo* odnosa (između *in vitro* oslobađanja i *in vivo* apsorpcije) i prividnog mehanizma apsorpcije *in vitro/in vivo* profila između prototip formulacije i komercijalnog preparata

U okviru *in vitro* analize, ispitano je pet komercijalnih proizvoda sa domaćeg i stranog tržišta, različitog kvalitativnog sastava, primenom pet *in vitro* testova ispitivanja brzine oslobađanja. Nađene su različite brzine oslobađanja teofilina u opsegu od 47% do preko 90% (u zavisnosti od preparata i primenjenog testa), uz zastupljenost praktično svih mehanizama oslobađanja kvazi Fick-ovom ili *Case I* kinetikom ( $n=0.42$ ), difuzijom ( $n=$  oko 0.50), anomalnim transportom ( $n=0.57-0.77$ ), *Case II* transportom ( $n=0.89$ ) kao i mehanizmom relaksacije ( $n=0.92$ ). Dobijeni slični profili oslobađanja ispitivanjem Testom 3 USP u odnosu na Test 1 USP ili Test 9 USP naveli su na pretpostavku da razlike pH vrednosti fosfatnog pufera ili tipa aparature nemaju uticaj na dinamiku oslobađanja teofilina iz ispitivanih preparata. Dobijeni slični profili oslobađanja pri sukcesivnoj zameni medijuma u toku vremena (metoda poluizmene) u odnosu na kompletnu zamenu medijuma posle prvog sata ispitivanja (Test 3 USP), ukazali su da se zbog veće jednostavnosti izvođenja, USP postupku može dati prednost.

Konstatovani slični profili oslobađanja teofilina, u opsegu pH =3.0-7.5, odnosno niži profili oslobađanja u medijumu pH=1.2, pri ispitivanju komercijalnog preparata aminofilina sa trenutnim oslobađanjem ukazali su na potrebu primene kombinacije medijuma u toku ispitivanja. Nađeno je da su, pri primeni aparature II USP rotirajuće lopatice i brzini mešanja 50rpm i aparature I USP rotirajuće korpice pri brzinama 50rpm i 100rpm dobijeni slični profili oslobađanja iz matriks tableta.

Na osnovu dobijenih *in vitro* rezultata konstatovano je da se za dalja ispitivanja može koristiti *in vitro* metod koji odgovara Test 3 USP: aparatura II USP sa rotirajućom lopaticom, brzina mešanja 50rpm, pri temperaturi  $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ , i 900ml medijuma: veštački želudačni sok bez pepsina u toku prvog sata i veštački crevni sok bez enzima od 2-8h ispitivanja.

Za potrebe razvoja prototip formulacije, poštujući koncept dizajna kvaliteta (*QbD*), definisan je ciljani profil kvaliteta proizvoda (QTPP). Analizom uticaja kritičnosti, utvrđeno je da na efikasnost i bezbednost kod pacijenta imaju uticaj kritični atributi kvaliteta gotovog proizvoda (CQA): fizički atributi (oblik/veličina) tablete,

sadržaj, uniformnost sadržaja i profil brzine rastvaranja. Prema FMECA modelu izvođenja inicijalne procene rizika konstatovano je da: atributi kvaliteta materijala aktivne supstance, koja pripada I grupi lekova po Biofarmaceutskom sistemu klasifikacije, ne pokazuju rizik za kvalitet gotovog proizvoda, pri primeni metode vlažne granulacije. Formulacione komponente i promenljive: granulati sa modifikovanim oslobađanjem teofilina, intragranularni matriks formirajući polimer (hidroksipropilmetilceluloza) i njegov udeo u ukupnom polimernom matriksu, imaju srednji nivo rizika na fizičke attribute kvaliteta tableta (oblik/veličinu), a zajedno sa ekstragranularnim polimerom (karbomer) visok nivo rizika na profil oslobađanja lekovite supstance; dok je uticaj na sadržaj i uniformnost sadržaja niskog nivoa rizika. Prisustvo vezivnog sredstva i nerastvornog punioca pokazuje srednji nivo rizika na fizičke attribute kvaliteta tableta.

Primenom analize punog faktorijalnog dizajna potvrđen je efekat značajnog usporavanja oslobađanja iz matriksa na bazi kombinacije Methocel® K100M najvišeg viskoziteta sa Carbopolom® 971P NF, što do sada nije bilo opisano u literaturi. Takođe je ovaj efekat konstatovan primenom nižeg udela karbomera, 12.5% u kombinaciji sa hidroksipropilmetilcelulozom, u odnosu na literaturom naveden (15%, 22.5%). Mehanizam nastanka značajnog usporavanja oslobađanja pri primeni kombinacije Methocel® K100M/Carbopol® 971P NF, pretpostavljeno je da se može pripisati sinergističkom uticaju oba polimera.

Dizajnom smeše postignut je razvoj formulacija matriks tableta na bazi intragranularno (Methocel® K100M ili Methocel® K4M) i ekstragranularno (Carbopol® 971P NF) kombinovanih polimera. Konstatovan je značajan obrnuto proporcionalni uticaj koncentracije karbomera na profil brzine rastvaranja teofilina.

Numerička optimizaciona procedura eksperimentalnog dizajna smeše omogućila je izdvajanje tri optimalne prototip formulacije uz izračunatu grešku predviđanja ispod 10%, i konkretne sastave formulacija sa optimizovanim udelima polimera i brzinama oslobađanja sličnim postavljenim ciljanim profilima.

Za sve tri optimizovane prototip formulacije konstatovano je produženo oslobađanje leka u *in vivo* uslovima na kunićima, za  $C_{max,}=7.61$  mg/L - 9.2 mg/L,  $T_{max}$  = 7.5h - 12.0h i  $AUC_{0\rightarrow 48h}$  = 115.90 mg h/L - 204.6 mg h/L, a relativna biološka raspoloživost teofilina bila je veća (105.5 % - 182.5 %) u poređenju sa komercijalnim preparatima.

Primenom linearne regresione analize nađena je korelacija nivoa A, kod *in vitro* i *in vivo* setova podataka za dve prototip formulacije i jedan komercijalni proizvod ( $R^2 = 0.977 - 0.991$ ). Usled uočenog intenzivnijeg *in vivo* oslobađanja teofilina u prvim satima ispitivanja, primenjen je vremenski faktor srazmere (*time scaling factor*) kod dobijenih *in vitro* profila oslobađanja, čime je uspostavljena korelacija uz nešto više vrednosti koeficijenta korelacije ( $R^2 = 0.982-0.995$ ) kod praktično svih ispitivanih tableta. Pri tome su za jednu prototip formulaciju i komercijalni proizvod, dobijeni koeficijenti pravca bliski jedinici (1.12 i 1.03). Intenzivniju brzinu resorpcije u prvim satima ispitivanja u poređenju sa *in vitro* oslobađanjem, najverovatnije je moguće objasniti sporijim formiranjem gel barijere *in vivo* i bržim oslobađanja leka iz bubrećeg matriks sistema. Poređenjem sličnosti setova podataka *in vitro/in vivo* profila prototip formulacije i komercijalnog preparata (u literaturi označeno kao prividno sličan mehanizam resorpcije, *similar apparent absorption mechanism*) primenom linearne regresione analize, nađena je korelacija kod dva para formulacija ( $R^2 = 0.962$  i  $0.949$ ). Na osnovu literaturnih navoda, uočena niža vrednost koeficijenta korelacije se može objasniti činjenicom da su poređeni preparati različitog sastava i mehanizma oslobađanja (porozni lipidni matriks i hidrofilni bubreći matriks).

Procena predvidivosti *in vitro/in vivo* modela, u intervalu do 8h ispitivanja za analizirane farmakokinetičke parametre ( $C_{8h}$  i  $AUC_{0 \rightarrow 8h}$ ) potvrđena je kod jedne prototip formulacije i jednog komercijalnog proizvoda (greška predviđanja manja od 15%), dok je kod ostale dve formulacije i jednog komercijalnog proizvoda greška predviđanja bila u granicama zahteva za  $AUC_{0 \rightarrow 8h}$ , ali veća od 15% za  $C_{8h}$ . Na osnovu literaturnih navoda, u slučaju prihvatljive greške predviđanja za  $AUC_{0 \rightarrow 8h}$ , predvidivost *in vitro/in vivo* modela se može smatrati prihvatljivom. Proističe da nađeni korelacioni model uz primenu vremenskog faktora srazmere, može biti primenljiv u daljim fazama razvoja tableta. Takođe predefinisana *in vitro* metoda ispitivanja pruža mogućnost predviđanja ponašanja preparata *in vivo*.

Poređenjem *in vivo* profila dobijenih na zdravim dobrovoljcima (iz raspoloživih publikacija) i *in vivo* eksperimentalno nađenih rezultata na kunićima, za jedan od komercijalnih preparata nađena je sličnost parametara  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  i  $C_{max}$ . Konstatovana je *in vitro/in vivo* korelacija nivoa A između *in vitro* brzine rastvaranja, posle primene vremenskog faktora srazmere i *in vivo* profila kod zdravih dobrovoljaca,  $R^2 = 0.986$  (kod Lin i sar, 1990) i  $R^2 = 0.985$  (za Möller i Langebucher, 1982). Dobijeni rezultati ukazuju



na opravdanost primene kunića kao životinjskog modela pri *in vivo* ispitivanjima u ranoj fazi razvoja farmaceutskog oblika, radi preliminarnih predviđanja *in vivo* ponašanja razvojnih formulacija.

**Ključne reči:** tablete sa modifikovanim oslobađanjem, aminofilin, teofilin, hidroksipropilmetilceluloza, karbomer, eksperimentalni dizajn smeše, *in vitro* brzina rastvaranja, *in vivo* resorpcija, *in vitro/in vivo* odnos, kunić,

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Farmaceutska tehnologija

**UDK:** 658.56 : 615.453.6 : 615.015.154 (043.3)

# **APPLICATION OF QUALITY BY DESIGN CONCEPT IN THE EARLY STAGE OF PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT FOR TABLETS WITH MODIFIED RELEASE OF THE ACTIVE SUBSTANCE**

## *Summary*

Research described in this study comprised the implementation of quality by design (*QbD*) concept from the early stage of product pharmaceutical development, for the preparation of aminophylline tablets with modified theophylline release. *QbD* tools and methods recommended by the new FDA and EMA guidelines were applied (Risk analysis, Design of Experiment DOE, Biopharmaceutical Classification System BCS, *in vitro* dissolution, *in vitro/in vivo* relationship).

The focus of the investigation involved: preliminary *in vitro* method selection intended for examination of aminophylline modified release tablets, as there are no officinal methods; development of the optimal formulation based on swellable matrix polymers (Methocel ® K100M and Carbopol 971P NF) with different chemical composition, matrix forming properties and different mechanism of drug release; identification of the Quality Target Product Profile (QTPP), Critical Quality Attributes (CQA) of the finished product, raw materials and formulation components; selection of the prototype formulation with an acceptable drug release profile; testing the feasibility of establishment of the *in vitro/in vivo* correlation for selected formulations; predictability of the selected *in vitro* method to describe the *in vivo* behavior of the product; the suitability of the rabbit as an animal model for the *in vivo* testing during the early stages of the formulation development.

The applied methodology involved: the application of four USP 30 tests (Test 1 USP, Test 3 USP, Test 6 USP, Test 9 USP officinal within the monograph of theophylline extended-release capsules) and the Half Change Method (in accordance with the instructions given by Ph. Eur 6.0), for the *in vitro* examination; DOE methodology application through the Full Factorial Design, Mixture Experimental Design and General One Factor Design; application of model-independent methods (dissimilarity factor  $f1$ , similarity factor  $f2$ ) and model-dependent methods (zero-order model, Higuchi square root model, Korsmayer-Peppas, power law model) for drug release rate and mechanism evaluation.

Within the *in vivo* evaluation, following methodology was applied: calculation of relative availability  $F_{rel}\%$  between the formulations, Wagner-Nelson method to calculate the percent of cumulative fraction of theophylline dose absorbed (%FD); back calculation from Wagner-Nelson equation of predicted drug plasma concentration; linear regression analysis for feasibility of *in vitro/in vivo* correlation (between *in vitro* dissolution and *in vivo* absorption profile) and *apparent absorption mechanism* (of *in vitro/in vivo* profiles between formulation and commercial product).

Five commercial products of different qualitative composition from domestic and foreign markets were analyzed by five *in vitro* methods. The obtained results showed the difference in theophylline release rate, in the range of 47% to over 90% (depending on product composition and the test method). The various release mechanisms were found: quasi Fick's diffusion or *Case I kinetics* ( $n=0.42$ ), diffusion ( $n\approx 0.50$ ), anomalous transport ( $n=0.57-0.77$ ), *Case II transport* ( $n=0.89$ ) as well as the mechanism of erosion/relaxation ( $n=0.92$ ). Similar release profiles were obtained after the examination by Test 3 USP compared to Test 1 USP or Test 9 USP which led to the assumption that the differences in phosphate buffer pH or the apparatus type have no effect on the theophylline release profile from tested tablets. Similar release profiles obtained after the portion media replacement during the specified time intervals of testing (Half Change Method) compared to the complete replacement of the media after the first hour of testing (Test 3 USP), indicated selection of USP method as easier for performance.

During the testing of commercial immediate release aminophylline tablets, similar release profiles of theophylline were obtained in the medium of pH 3.0-7.5 range and lower values found for pH 1.2 medium, indicating that both media should be applied as a part of *in vitro* method examination. Similar dissolution profiles were obtained during the examination of matrix tablets in apparatus II USP paddle, (speed 50rpm) or apparatus I USP basket (speed 50rpm and 100rpm).

On the basis of the obtained *in vitro* results it was concluded that *in vitro* test similar to Test 3 USP should be applied in further examinations: apparatus II USP paddle, stirring speed 50rpm, at a temperature of  $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , and 900ml of media: simulated gastric fluid without pepsin during the first hour examination and simulated intestinal fluid without enzymes for the second hour and thereafter 2-8h examination.

According to the *QbD* concept, at the beginning of the prototype formulation development, Quality Target Product Profile (QTPP) was identified. The criticality analysis further leads to identification of finished product Critical Quality Attributes (CQA) that are critical to efficacy and safety from the perspective of patient (physical attributes tablet shape/size, content/uniformity and the release profile). Initial risk assessment (based on FMECA methodology) pointed out that for BSC class I drug material quality attributes of the active substance did not indicate a risk to the quality of the finished product if wet granulation method was applied. Formulation components and variables (granulate with modified release of theophylline, intragranular matrix forming polymer, hydroxypropylmethylcellulose, and its ratio in total polymer matrix), showed a medium level of risk to the physical attributes of tablet quality (shape/size) and together with extragranular polymer (carbomer) high level of risk to drug release profile; while their impact to the content and content uniformity was low. Presence of the binding agent and insoluble diluent, shows medium risk level to the physical attributes of the tablet quality.

Based on a Full Factorial Design analysis, significant retardation in drug release was found for matrices based on the combination of the highest viscosity Methocel® K100M and Carbopol® 971P NF, which has not been reported in the literature. Also, the effect was confirmed by using a lower amount of carbomer, of 12.5% in combination with hydroxypropylmethylcellulose, compared to the literature data (15%, 22.5%). It is assumed that the effect of Methocel® K100M/Carbopol® 971P NF release retardation should be attributed to synergistic effect of both polymers.

Mixture Experimental Design model was applied for development of the matrix tablet formulations, based on combination of polymers: intragranular (Methocel® K100M or Methocel® K4M) and ekstragranular (Carbopol® 971P NF). The significant inversely proportional influence of carbomer ratio on theophylline release profile was noticed. Numerical optimization procedure of mixture design enabled the selection of the three optimal prototype formulations, with the calculated prediction error below 10%, and quantitatively defined tablet compositions with optimized polymer amounts and the release profiles similar to target values.

Prolonged theophylline release *in vivo* in rabbits, for all three optimized prototype formulations were found, with values of  $C_{max} = 7.61 \text{ mg/L} - 9.2 \text{ mg/L}$ ,  $T_{max} = 7.5 \text{ h} -$

12.0h and  $AUC_{0 \rightarrow 48h} = 115.90 \text{ mg h/L} - 204.6 \text{ mg h/L}$ , while the relative bioavailability was higher (105.5% - 182.5%) compared to the commercial products.

Linear regression analysis demonstrated a good correlation of Level A, between *in vitro* and *in vivo* data sets for the two prototype formulations and one commercial product ( $R^2=0.977-0.991$ ). Due to the observed rapid theophylline release *in vivo* at the beginning of the examination, *the time scaling factor* was applied on the *in vitro* obtained profiles, which led to the correlation with a slightly higher correlation coefficient values ( $R^2=0.982-0.995$ ) for almost all the examined tablets. For one prototype formulation and commercial product, the obtained values for slope were close to one (1.12 and 1.03). Faster absorption rate in the first hours of testing compared to *in vitro* release should be probably explained by the slower gel barrier formation *in vivo*, with more rapid drug release from swellable matrix system. Comparing the similarity of *in vitro* / *in vivo* profiles between prototype formulation and commercial product (indicated in the literature as *similar apparent absorption mechanism*) by linear regression analysis, the good correlation was found for the two compared sets of data ( $R^2=0.962$  and  $0.949$ ). Obtained coefficient correlation of lower values, should be explained on the bases of the literature data, by the fact that the products compared were of different composition and release mechanism (porous lipid matrix and hydrophilic swelling matrix).

Predictability of the *in vitro/in vivo* model, for the interval of up to 8h examination, for tested pharmacokinetic parameters ( $C_{8h}$  and  $AUC_{0 \rightarrow 8h}$ ), was confirmed for one prototype formulation and one commercial product (the prediction error was less than 15%), while for the other two formulations and one commercial product prediction error was within the limits required for  $AUC_{0 \rightarrow 8h}$ , but greater than 15% for  $C_{8h}$ . Based on the literature data, in a case of acceptable prediction error for  $AUC_{0 \rightarrow 8h}$ , the predictability of the *in vitro/in vivo* model can be considered acceptable. It can be assumed that applied correlation model with the implementation of the *time scaling factor* can be feasible for the further stages of tablet development. Also, the predefined *in vitro* method, could enable the predictability of the product behavior *in vivo*.

Comparing the *in vivo* profiles obtained in healthy volunteers (available literature data) and *in vivo* experimental results found in rabbits, for one of the commercial product the similarity of parameters  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  and  $C_{max}$  was found. *In vitro/in vivo*

correlation of Level A, between *in vitro* dissolution rate after implementation of the *time scaling factor* and *in vivo* resorption profiles in healthy volunteers was established  $R^2=0.986$  (for Lin et al, 1990) and  $R^2 = 0.985$  (for Möller and Langebucher, 1982). The results indicate that there is a reasonable assumption that the rabbit might be used as an animal model for *in vivo* studies in the early stages of the dosage form development, as well as for the preliminary prediction of *in vivo* behavior of prepared formulations.

**Key words:** modified release tablets, aminophylline, theophylline, hydroxypropylmethylcellulose, carbomer, mixture experimental design, *in vitro* dissolution, *in vivo* resorption, *in vitro/in vivo* relationship, rabbit,

**Scientific field:** Pharmacy

**Scientific discipline:** Pharmaceutical technology

**UDC:** UDK: 658.56 : 615.453.6 : 615.015.154 (043.3)

# SADRŽAJ

<b>1.</b>	<b>OPŠTI DEO</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>PRIMENA KONCEPTA DIZAJNA KVALITETA U FAZI FARMACEUTSKOG RAZVOJA PROIZVODA</b>	<b>2</b>
1.1.1	Pregled strategije koncepta dizajna kvaliteta u odnosu na tradicionalni pristup "testiranjem do kvaliteta" u toku farmaceutskog razvoja proizvoda	2
<b>1.1.2</b>	<b>KONCEPT DIZAJNA KVALITETA – PREPORUČENA METODOLOGIJA</b>	<b>4</b>
1.1.2.1.	Ciljani profil proizvoda i ciljani profil kvaliteta proizvoda	7
1.1.2.2.	Kritični atributi kvaliteta aktivne spustance, pomoćnih materija, poluproizvoda, međuproizvoda i gotovog proizvoda	8
1.1.2.3.	Kritični parametri procesa	9
1.1.2.4.	Prostor za dizajn	13
1.1.2.5.	Strategija kontrole i upravljanje životnim ciklusom proizvoda	14
1.1.2.6.	Kritičnost i principi definisanja kritičnosti	16
<b>1.1.3.</b>	<b>METODOLOGIJA PROCENE RIZIKA</b>	<b>19</b>
1.1.3.1.	Procena rizika u službi koncepta dizajna kvaliteta	20
<b>1.1.4.</b>	<b>ULOGA DIZAJNA EKSPERIMENTA U OKVIRU KONCEPTA DIZAJNA KVALITETA</b>	<b>26</b>
<b>1.1.5.</b>	<b>PRIMENA SISTEMA BIOFARMACEUTSKE KLASIFIKACIJE U OKVIRU KONCEPTA DIZAJNA KVALITETA</b>	<b>28</b>
<b>1.1.6.</b>	<b><i>IN VITRO</i> / <i>IN VIVO</i> ODNOS I NJEN ZNAČAJ U OKVIRU KONCEPTA DIZAJNA KVALITETA</b>	<b>32</b>
1.1.6.1.	<i>In vivo</i> ispitivanja	35
1.1.6.2.	Primena eksperimentalnih životinja, kao modela za <i>in vivo</i> ispitivanja	36
1.1.6.3.	<i>In vitro</i> ispitivanja	39
<b>1.2.</b>	<b>MODEL SUPSTANCA: AMINOFILIN, TEOFILIN</b>	<b>41</b>
1.2.1.	Fizičko - hemijske karakteristike aminofilina i teofilina	41
1.2.2.	Farmakodinamika i farmakokinetika teofilina	42
1.2.3.	Pregled literaturnih podataka o farmakokinetičkoj analizi i mogućnosti uspostavljanja <i>in vitro/in vivo</i> odnosa za preparate	44

	aminofilina/teofilina na ljudima	
1.2.4.	Pregled literaturnih podataka o farmakokinetičkoj analizi i mogućnosti uspostavljanja <i>in vitro/in vivo</i> odnosa za preparate aminofilina/teofilina kod životinja	46
<b>1.3.</b>	<b>HIDROFILNI MATRIKS SISTEMI SA MODIFIKOVANIM OSLOBADANJEM LEKOVITE SUPSTANCE</b>	<b>48</b>
1.3.1.	Hidroksipropilmetilceluloza kao sredstvo za postizanje usporenog oslobađanja	48
1.3.2.	Karbomer kao sredstvo za postizanje usporenog oslobađanja	49
1.3.3.	Kombinovanje polimera za postizanje usporenog oslobađanja	50
1.3.4.	Mehanizam oslobađanja lekovite supstance iz tableta na bazi kombinacije polimera (hidroksipropilmetilceluloze i karbomera)	51
<b>2.</b>	<b>CILJ ISTRAŽIVANJA</b>	<b>56</b>
<b>3.</b>	<b>EKSPERIMENTALNI DEO</b>	<b>59</b>
<b>3.1.</b>	<b>IN VITRO ISPITIVANJA</b>	<b>60</b>
<b>3.1.1.</b>	<b>Materijali i metode</b>	<b>60</b>
3.1.1.1.	Materijali	60
3.1.1.2.	Metode	62
3.1.1.2.1.	Dizajn eksperimenta	62
3.1.1.2.2.	Izrada matriks tableta	62
3.1.1.2.3.	<i>In vitro</i> ispitivanje brzine rastvaranja teofilina iz tableta	63
3.1.1.2.4.	Primena model-zavisnih i model-nezavisnih metoda u analizi profila brzine rastvaranja teofilina iz tableta	63
<b>3.1.2.</b>	<b>Ispitivanje brzine rastvaranja komercijalnih preparata aminofilina i teofilina sa modifikovanim oslobađanjem</b>	<b>64</b>
3.1.2.1.	Metode	64
3.1.2.1.1.	Pregled korišćenih <i>in vitro</i> testova ispitivanja	64
3.1.2.2.	Rezultati i diskusija	66
3.1.2.2.1.	Analiza profila brzine rastvaranja teofilina iz tableta primenom model-zavisnih metoda	78
<b>3.1.3.</b>	<b>Ispitivanje brzine rastvaranja teofilina iz komercijalnog preparata sa trenutnim oslobađanjem</b>	<b>83</b>
3.1.3.1.	Metode	83



3.1.3.2.	Rezultati i diskusija	84
<b>3.1.4.</b>	<b>Uticaj eksperimentalnih uslova i fizičkih atributa (veličina/oblik) kvaliteta tablete na obrzinu oslobađanja teofilina</b>	<b>87</b>
3.1.4.1.	Metode	87
3.1.4.1.1.	<i>In vitro</i> ispitivanje brzine rastvaranja pri različitim eksperimentalnim uslovima	87
3.1.4.1.2.	Dizajn eksperimenta	87
3.1.4.2.	Rezultati i diskusija	89
3.1.4.2.1.	Analiza profila brzine rastvaranja teofilina iz tableta primenom model-zavisnih metoda	95
3.1.4.2.2.	Analiza faktorskih efekata	96
<b>3.2.</b>	<b>FARMACEUTSKO - TEHNOLOŠKA ISPITIVANJA HIDROFILNIH MATRIKS SISTEMA NA BAZI HPMC I KARBOMERA</b>	<b>100</b>
<b>3.2.1.</b>	<b>Materijali i metode</b>	<b>100</b>
3.2.1.1.	Materijali	100
3.2.1.2.	Metode	100
3.2.1.2.1.	Dizajn eksperimenta	100
3.2.1.2.2.	Izrada matriks tableta	101
3.2.1.2.3.	Karakterizacija fizičkih atributa kvaliteta tableta	101
3.2.1.2.4.	<i>In vitro</i> ispitivanje brzine rastvaranja teofilina iz matriks tableta	102
3.2.1.2.5.	Primena model-zavisnih i model-nezavisnih metoda u analizi profila brzine rastvaranja teofilina iz tableta	102
<b>3.2.2.</b>	<b>Identifikovanje potencijalnog ciljanog profila kvaliteta proizvoda i procena kritičnih atributa kvaliteta gotovog proizvoda, materijala i formulacije</b>	<b>103</b>
3.2.2.1.	Rezultati i diskusija	105
3.2.2.1.1.	Preliminarna procena uticaja, kritičnosti, atributa kvaliteta gotovog proizvoda, na osnovu postavljenog ciljanog profila kvaliteta proizvoda	105
3.2.2.1.2.	Inicijalna procena rizika uticaja atributa kvaliteta aktivne supstance na prethodno definisane kritične attribute kvaliteta gotovog proizvoda	108
3.2.2.1.3.	Inicijalna procena rizika uticaja formulacionih komponenata i formulacionih promenljivih na kritične attribute kvaliteta gotovog proizvoda	114
<b>3.2.3.</b>	<b>Procena uticaja intragranularno i ekstragranularno prisutnih</b>	<b>122</b>

	<b>matriks formirajućih polimera na brzinu oslobađanja teofilina</b>	
3.2.3.1.	Metode	122
3.2.3.1.1.	Dizajn eksperimenta	122
3.2.3.2.	Rezultati i diskusija	123
3.2.3.2.1.	Karakterizacija fizičkih atributa tableta	123
3.2.3.2.2.	<i>In vitro</i> ispitivanje brzine rastvaranja teofilina iz tableta	124
3.2.3.2.3.	Analiza profila brzine rastvaranja teofilina iz tableta primenom model-zavisnih metoda	126
3.2.3.2.4.	Analiza faktorskih efekata	127
<b>3.2.4.</b>	<b>Primena eksperimentalnog dizajna smeše u razvoju formulacije matriks tableta na bazi intragranularno i ekstragranularno kombinovanih polimera</b>	<b>129</b>
3.2.4.1.	Metode	129
3.2.4.1.1.	Dizajn eksperimenta	129
3.2.4.2.	Rezultati i diskusija	131
3.2.4.2.1.	Karakterizacija fizičkih parametara tableta	131
3.2.4.2.2.	<i>In vitro</i> ispitivanje brzine rastvaranja teofilina iz tableta	132
3.2.4.2.3.	Analiza profila brzine rastvaranja teofilina iz tableta primenom model-zavisnih metoda	139
3.2.4.2.4.	Analiza faktorskih efekata	141
<b>3.2.5.</b>	<b>Optimizacija formulacije matriks tableta primenom eksperimentalnog dizajna smeše i izbor prototip formulacije</b>	<b>144</b>
3.2.5.1.	Metode	144
3.2.5.1.1.	Optimizacioni dizajn	144
3.2.5.2.	Rezultati i diskusija	146
3.2.5.2.1.	Poređenje profila i izbor prototip formulacije	149
<b>3.3.</b>	<b>ISPITIVANJE <i>IN VITRO</i> / <i>IN VIVO</i> ODNOSA</b>	<b>152</b>
<b>3.3.1.</b>	<b>Materijali i metode</b>	<b>152</b>
3.3.1.1.	Materijali	152
3.3.1.2.	Metode	153
3.3.1.3.	Analiza <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> rezultata	153
<b>3.3.2.</b>	<b>Rezultati i diskusija</b>	<b>157</b>
3.3.2.1	Analiza <i>in vitro</i> rezultata	157

3.3.2.2	Analiza i poređenje farmakokinetičkih parametara	161
3.3.2.2.1	Dizajn eksperimenta u proceni značajnosti razlike kod dobijenih farmakokinetičkih parametara	163
3.3.2.3.	Uticaj sastava formulacija na dobijene brzine rastvaranja i resorpcione profile	167
3.3.2.4.	Analiza mogućnosti uspostavljanja <i>in vitro/in vivo</i> odnosa za prototip formulacije i komercijalne preparate	169
3.3.2.5	Provera mogućnosti uspostavljanja <i>in vitro/in vivo</i> odnosa između prototip formulacija i komercijalnih preparata	178
3.3.2.6.	Provera predvidivosti uspostavljenog <i>in vitro/in vivo</i> modela i predvidivosti primenjenog <i>in vitro</i> testa ispitivanja brzine rastvaranja	182
3.3.2.7	Procena mogućnosti primene kunića kao životinjskog modela za <i>in vivo</i> ispitivanja u ranoj fazi razvoja formulacije	184
3.3.2.8.	Izbor optimalne prototip formulacije za dalja ispitivanja	190
<b>4.</b>	<b>ZAKLJUČAK</b>	<b>190</b>
<b>5.</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>201</b>
	<b>BIOGRAFIJA AUTORA</b>	
	<b>PRILOZI: IZJAVE</b>	

# **1. OPŠTI DEO**

## **1.1. PRIMENA KONCEPTA DIZAJNA KVALITETA U FAZI FARMACEUTSKOG RAZVOJA PROIZVODA**

Najnovije smernice, preporučene od strane EMA i FDA: ICH Q8(R2)-*Pharmaceutical Development* (EMA, 2009), ICH Q9-*Quality Risk Management* (EMA, 2011a) i ICH Q10-*Pharmaceutical Quality System* (EMA, 2011b) u ovom trenutku utiču i menjaju i regulatorne zahteve i strategiju farmaceutskog razvoja, sa tendencijom stalnog rasta uticaja (Lionberger, 2008).

Suština strategije na kojoj bazira celokupni novi pristup, opisana smernicom ICH Q8(R2), počinje od rane faze razvoja proizvoda i proteže se u toku celog životnog ciklusa (*Product Life Cycle*) sa ciljem što potpunijeg razumevanja i proizvoda i procesa.

### **1.1.1. Pregled strategije koncepta dizajna kvaliteta u odnosu na tradicionalni pristup "testiranjem do kvaliteta" u toku farmaceutskog razvoja proizvoda**

Tradicionalni pristup, nazvan "testiranjem do kvaliteta" (*Quality by Testing, QbT*), može se definisati, kao pristup kojim se farmaceutski kvalitet postiže ispunjenjem regulatornih zahteva i prethodno ustanovljenih atributa kvaliteta (Woodcock, 2004), putem stalnih testiranja (sirovina, međuproizvoda, gotovih proizvoda) u svim fazama proizvodnog procesa i koji je opisan kroz ustanovljene specifikacije i usko postavljene granice.

Novi pristup, označen kao "dizajnom do kvaliteta" (*Quality by Design, QbD*), predstavlja sistematski pristup razvoju sa zahtevom za što potpunijim razumevanjem proizvoda, procesa i procesne kontrole, zasnovan na naučnom pristupu i upravljanju rizikom u toku celog životnog ciklusa jednog proizvoda (Yu, 2008; Trivedi, 2012). Pregled postulata stare, "testiranjem do kvaliteta", i nove strategije "dizajnom do kvaliteta", prikazan je u tabeli 1.1. (Trivedi, 2012).

Globalni zahtevi kvaliteta novog proizvoda i dalje ostaju isti: obezbeđenje potrebnog farmaceutskog kvaliteta, bezbednosti i efikasnosti leka.

Farmaceutski kvalitet proizvoda, prema konceptu dizajna kvaliteta, identifikuje se kroz faktore definisane kao kritične za kvalitet ali iz perspektive pacijenta; ovi faktori se povezuju sa atributima kvaliteta proizvoda i ekscipijenasa i utvrđuje kako kritični

parametri procesa mogu biti varirani a da se postigne dobijanje proizvoda konzistentnog kvaliteta.

Tabela 1.1. Pregled stare, "testiranjem do kvaliteta", i nove strategije, "dizajnom do kvaliteta" u farmaceutskom razvoju, (Trivedi, 2012)

Tradicionalni pristup- <i>QbT (Quality by Testing)</i>	Preporučeni pristup - <i>QbD (Quality by Design)</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kvalitet se obezbeđuje testiranjem i inspekcijom</li> <li>• Intenzivno prikupljanje podataka – bez globalne sistematičnosti u smislu povezanosti informacija u "kompletanu sliku"</li> <li>• Specifikacije bazirane na istorijskim podacima proizvedenih šarži</li> <li>• Tok procesa "zamrznut", bez podsticaja na promene</li> <li>• Akcenat na reproduktivnosti procesa / proizvoda, često zaobilazeći / ignorišući varijacije</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kvalitet ugrađen u proizvod / proces kroz dizajn zasnovan na naučnom pristupu</li> <li>• Prikupljanje znanja na sistematičan način – obezbeđuje dobro poznavanje proizvoda i razumevanje procesa</li> <li>• Specifikacije bazirane na zahtevima za profil proizvoda (<i>product performance requirements</i>)</li> <li>• Fleksibilnost procesa u okviru prostora za dizajn, dozvoljavajući kontinuirano unapređenje</li> <li>• Akcenat na robustnosti procesa, razumevanje i kontrola varijacija</li> </ul>

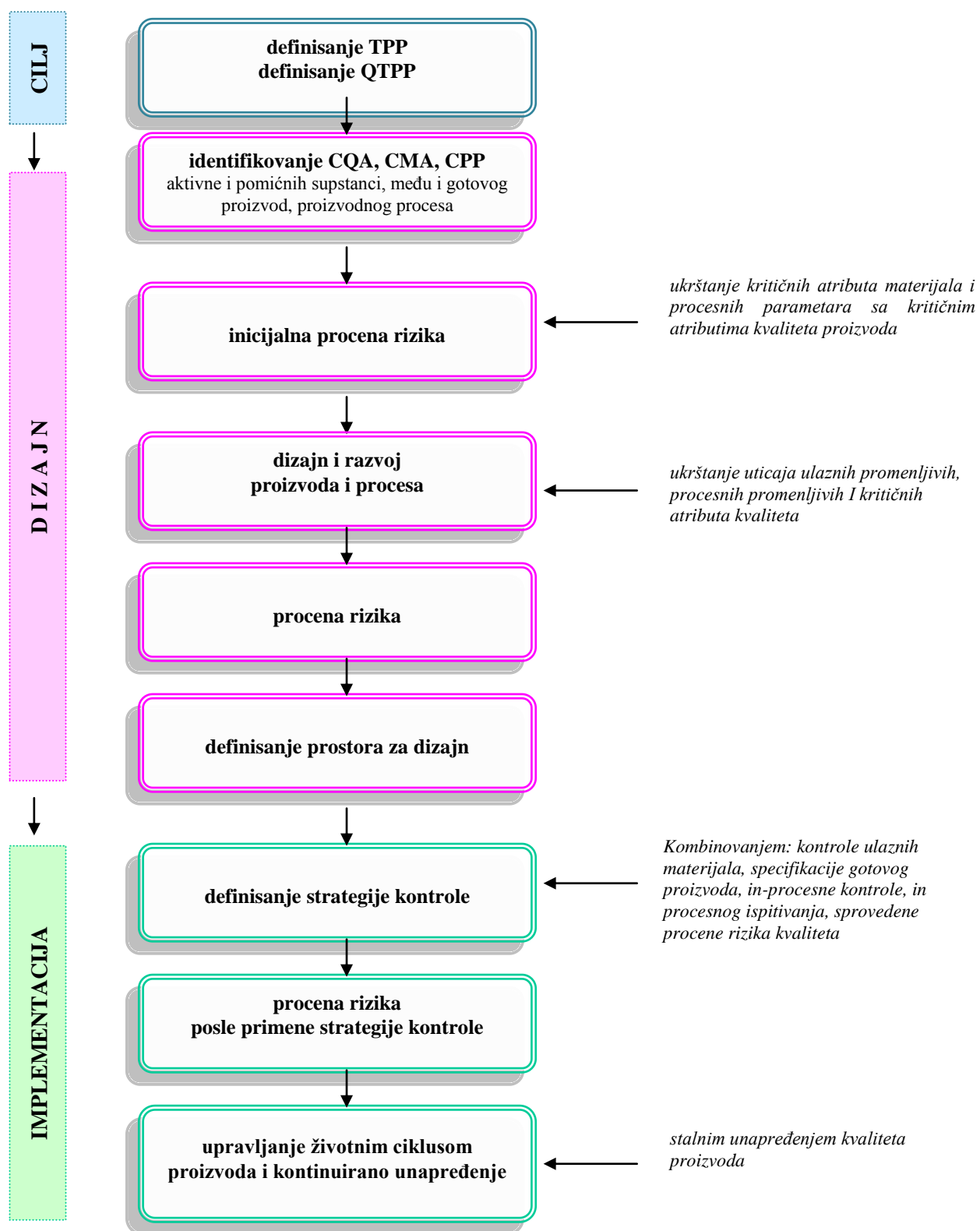
Efikasnost proizvoda se prati preko parametara kao što su: sadržaj i brzina rastvaranja, koji predstavljaju kritične karakteristike svakog proizvoda, a ispitivanje brzine rastvaranja *in vitro* treba da odražava i *in vivo* efekat, rastvaranje i apsorpciju (biorelevantan) što je više moguće.

Bezbednost proizvoda, se prati preko kriterijuma prihvatljivosti za nečistoće, koje trebaju biti postavljene na osnovu definisanog biološkog nivoa bezbednosti (*biological safety level*) određenog kliničkim studijama bezbednosti (*safety / clinical studies*) ili studijama toksičnosti.

### 1.1.2. KONCEPT DIZAJNA KVALITETA–PREPORUČENA METODOLOGIJA

Preporučeni sled aktivnosti (Lionberger i sar, 2008; Yu., 2008; Trivedi, 2012) u razvoju novog proizvoda primenom dizajna kvaliteta, šematski prikazan na slici 1.1. podrazumeva:

- postavljanje **ciljanog profila proizvoda (TPP - target product profile)**, koji opisuje primenu, bezbednost i efikasnost preparata;
- definisanje **ciljanog profila kvaliteta proizvoda (QTPP - quality target product profile)**, koji je osnova razvoja formulacije i proizvodnog procesa;
- primena **procene rizika (RA – Risk assesment)** u izdvajanju najmanje poznatih oblasti za dalja ispitivanja na osnovu prikupljenih do tog trenutka raspoloživih podataka o aktivnoj supstanci, potencijalnim pomoćnim materijama i procesnim operacijama;
- dizajniranje formulacije i identifikovanje **kritičnih atributa materijala / kritičnih atributa kvaliteta** finalnog proizvoda (**CMA – critical meterial attributes/ CQA – critical quality attributes**) koji moraju biti kontrolisani da bi se ispunili zahtevi ciljanog profila kvaliteta proitvoda;
- **dizajniranje proizvodnog procesa** koji će dati gotov proizvod sa prethodno definisanim kritičnim atributima materijala i kritičnim atributima kvaliteta finalnog proizvoda;
- identifikovanje **kritičnih procesnih parametara (CPP – critical process parameters)** i kritičnih atributa ulaznih materijala, koji moraju biti kontrolisani da bi se ispunili kritični atributi kvaliteta gotovog proizvoda; upotreba procene rizika za izdvajanje procesnih parametara i atributa materijala koji moraju biti verifikovani kroz eksperimente; kombinovanje prethodnih znanja sa eksperimentalno dobijenim da bi se ustanovio **prostor za dizajn (Design Space)** ili neki drugi opis razumevanja procesa;
- utvrđivanje **strategije kontrole (Control Strategy)** celog procesa; strategija mora da obuhvati kontrolu ulaznih materijala, praćenje i kontrolu procesa, prostor za dizajn kako pojedinačnih tako i višefaznih operacija, ispitivanje gotovog proizvoda; strategija bi trebalo da obuhvati i očekivane promene u veličini serije.
- neprekidno praćenje procesa da bi se obezbedio stalan kvalitet.

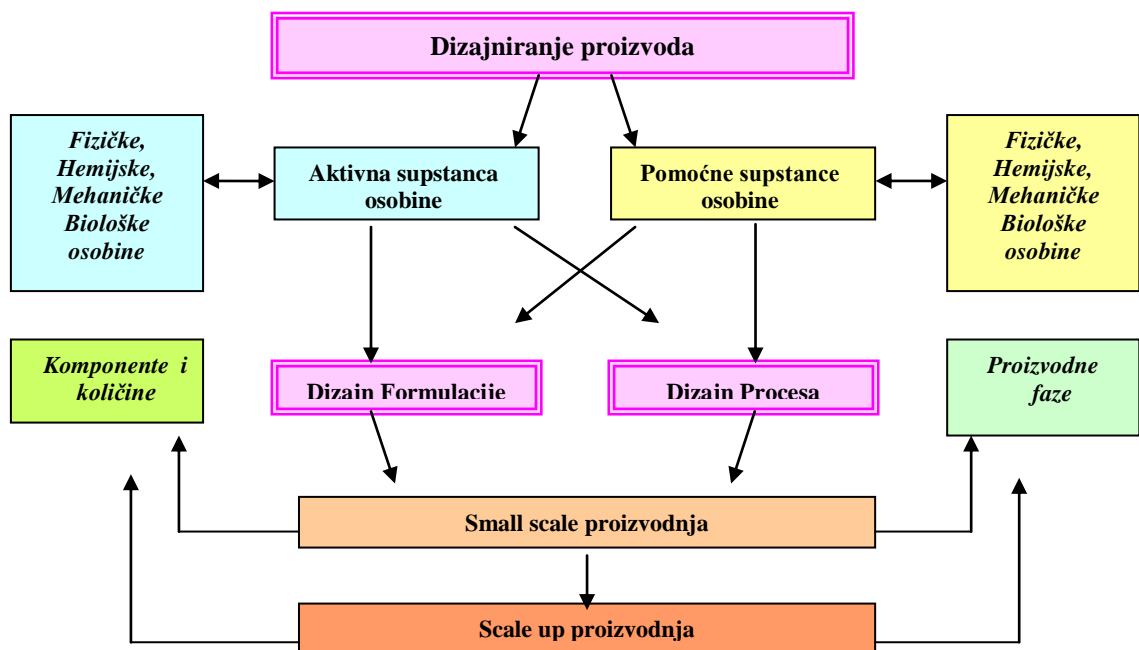


Slika 1.1. Koncept dizajna kvaliteta – preporučena metodologija, (Trivedi, 2012; Charoo i sar. 2012)



Razlika u konceptu dizajna kvaliteta kod generičkih lekova (*Abbreviated new drug application*, ANDA product) i inovatornih lekova (*New drug application*, NDA product), je samo u fazi kliničkih i farmakoloških ispitivanja, gde je za inovatorne lekove ciljani profil proizvoda u fazi istraživanja, a kod generika je već ustanovljen kliničkim studijama za potrebe registracije.

Dizajn eksperimenta (*Design of Experiments*, DOE) i procena rizika (Lionberger i sar., 2008), biofarmaceutski sistem klasifikacije (*Biopharmaceutical Classification System*, BCS), prema Yu, 2008 i Cook, 2008, *in vitro/in vivo* odnos (*In vitro/in vivo relationship*, IVIVR) (Nainar i sar., 2012), brzina rastvaranja i *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja (D'ouza i sar., 2010; Tong i sar.,2007; Selen, 2007) su alatke za rad u okviru *QbD* pristupa.



Slika 1.2. Pregled aktivnosti dizajniranja proizvoda, (Yu, 2012)

Aktivnost dizajniranja novog proizvoda obuhvata dizajn farmaceutskog oblika i dizajn procesa koji se moraju istraživati paralelno, slika 1.2.. To podrazumeva da se aktivna supstanca, ekscipijensi, parametri procesa i atributi kvaliteta moraju ispitati u pogledu kritičnosti za proizvod, kao i mogućeg uticaja među pobrojanim atributima i definisati prihvatljive vrednosti. Uticaj na scale-up, takođe mora biti poznat.

### 1.1.2.1. Ciljani profil proizvoda i ciljani profil kvaliteta proizvoda

**Ciljani profil proizvoda** (*Target Product Profile*, TPP), prema FDA (CDER, 2007), opisuje farmakološke, toksikološke i kliničke zahteve proizvoda sa konačnom namenom pripreme deklaracije/uputstva za pacijenta i lekare (tabela 1.2.) i strukturno je organizovan po istim poglavljima kao i uputstvo, te stoga sadrži opis načina aplikacije, min/max dozu, ciljanu populaciju pacijenata – koja diktira najprikladniji farmaceutski oblik i način aplikacije (npr u pedijatriji zbog lakše aplikacije je zahtev sirup/tablete za žvakanje).

**Ciljani profil kvaliteta proizvoda** (*Quality Target Product Profile*, QTPP), EMA kroz ICH Q8(R2) (2009) definiše, kao pregled karakteristika lekovitog proizvoda koji treba da bude postignut, da bi se obezbedio željeni kvalitet, ali uzimajući u obzir ciljano farmakološko dejstvo, bezbednost i efikasnost lekovitog proizvoda. Ciljani profil kvaliteta proizvoda predstavlja nadogradnju zahteva ustanovljenih u okviru ciljanog profila proizvoda (tabela 1.2.).

Tabela 1.2. Uporedni pregled parametara koje obuhvata ciljani profil proizvoda, TPP, i ciljani profil kvaliteta proizvoda, QTPP, (Yu, 2012)

<i>Ciljani profil proizvoda TPP</i>	<i>Ciljani profil kvaliteta proizvoda QTPP</i>
➤ <i>Opis proizvoda</i>	❖ <i>Dozirani oblik</i>
➤ <i>Klinička farmakologija</i>	❖ <i>Izgled proizvoda, oblik, dimenzija</i>
➤ <i>Oblast primene i način upotrebe</i>	❖ <i>Identifikacija</i>
➤ <i>Kontraindikacije</i>	❖ <i>Jačin / doza</i>
➤ <i>Upozorenja</i>	❖ <i>Sadržaj</i>
➤ <i>Mere opreza</i>	❖ <i>Uniformnost sadržaja</i>
➤ <i>Nežanjena dejstva</i>	❖ <i>Nečistoće</i>
➤ <i>Zavisnost</i>	❖ <i>Stabilnost</i>
➤ <i>Predoziranje</i>	❖ <i>Raspadljivost ili</i>
➤ <i>Doziranje i način primene</i>	❖ <i>Brzina rastvaranja</i>
➤ <i>Način izdavanja leka</i> (na / bez Rp, poseban režim izdavanja)	❖ <i>Farmakokinetička ispitivanja</i>
➤ <i>Farmakološke i toksikološke studije</i> (na životinjskim modelima)	❖ <i>Bioraspoloživost / bioekvivalencija</i>
➤ <i>Kliničke studije (na ljudima)</i>	❖ <i>Dodatni zahtevi kod specifičnih farmaceutskih oblika (veličina čestica suspenzije, adhezija TTS)</i>

Ciljani profil kvaliteta proizvoda je obuhvatniji jer sadrži i stabilnost, specifične zahteve farmaceutskog oblika (npr veličina čestica, brzina rastvaranja kod oralnih suspenzija, adhezija transdermalnih sistema), bioekvivalenciju, pa se ne može smatrati specifikacijom gotovog proizvoda pošto sadrže i testove koji nisu predmet ispitivanja kod puštanja serije leka u promet, ali se može iskoristiti kao polazni za definisanje Specifikacije proizvoda u ranoj fazi razvoja.

### 1.1.2.2. Kritični atributi kvaliteta aktivne supstance, pomoćnih materija, poluproizvoda, međuproizvoda i gotovog proizvoda

**Kritični atributi kvaliteta** (*Critical Quality Attributes*, CQAs), EMA, ICH Q8(R2), 2009, su fizičke, hemijske, biološke ili mikrobiološke osobine ili karakteristike unutar odgovarajućih granica, opsega ili raspodela da bi se obezbedio željeni kvalitet proizvoda. Primenuju se za: aktivnu supstancu, pomoćne materije, poluproizvode, međuproizvode i gotov proizvod.

Kritični atributi kvaliteta za aktivne supstance i pomoćne materije, se u literaturi često pominju i kao kritični atributi ulaznih materijala (*Critical Raw Material Attributes*, CMA), a do sada su bili izučavani u predformulacionoj fazi; pregled potencijalnih kritičnih atributa materijala dat je u tabeli 1.3.

Količina/učešće aktivnih i pomoćnih supstanci u formulaciji se takođe svrstava u kritične attribute ulaznih materijala (Jiang, 2009).

Tabela 1.3. Pregled potencijalnih kritičnih atributa materijala aktivnih i pomoćnih supstanci CMAs, (Jiang, 2009; Trivedi, 2012)

<i>Potencijalni kritični atributi materijala aktivnih i pomoćnih supstanci, CMAs</i>	
<b><i>Fizički atributi</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Boja, miris, ukus</i></li> <li>• <i>Veličina i distribucija veličine čestica</i></li> <li>• <i>Oblik čestica i distribucija oblika,</i></li> <li>• <i>Kristalna struktura</i></li> <li>• <i>Polimorfni oblik</i></li> <li>• <i>Tačka topljenja</i></li> <li>• <i>Higroskopnost</i></li> </ul>
<b><i>Mehanički atributi</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Nasipna / sabijna gustina</i></li> <li>• <i>Ukupna slobodna površina</i></li> <li>• <i>Elektrostatičko naelektrisanje i površinska energija</i></li> <li>• <i>Elastičnost / viskoelastičnost / plastičnost / krtoš</i></li> <li>• <i>Kompresibilnost</i></li> </ul>
<b><i>Hemijski atributi</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>pKa</i></li> <li>• <i>Hidrosolubilnost u funkciji pH</i></li> <li>• <i>Hemijska stabilnost u čvrstom / tečnom stanju</i></li> <li>• <i>Oksidativna i foto stabilnost</i></li> </ul>
<b><i>Biološki atributi</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Particioni koeficijent</i></li> <li>• <i>Membranska permeabilnost</i></li> <li>• <i>Bioraspoloživost farmaceutskih oblika</i></li> </ul>
<b><i>Mikrobiološki atributi</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Mikrobiološka čistoća</i></li> <li>• <i>Sterilnost</i></li> </ul>
<b><i>Atributi vezani za formulaciju</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Količina / učešće lekovite i pomoćnih supstanci</i></li> </ul>

Potencijalna lista kritičnih atributa kvaliteta gotovog proizvoda, proističe iz zahteva kod ciljanog profila kvaliteta proizvoda i kod čvrstih doziranih oblika u osnovne CQAs

spadaju: prisustvo nečistoća, sadržaj/ uniformnost, profil brzine oslobađanja i stabilnost; a kod drugih farmaceutskih oblika mogu biti priključeni specifični zahtevi dotičnog sistema (sterilnost kod parenteralnih formi, adhezivna svojstva TDS, veličina čestica kod inhalacija ili sirupa tipa suspenzija).

### 1.1.2.3. Kritični parametri procesa

**Kritični parametri procesa** (*Critical Process Parameters, CPPs*), EMA ICH Q8(R2), 2009, su veličine čije variranje može imati uticaj na kritične atribute kvaliteta i stoga moraju biti praćeni ili kontrolisani kako bi se obezbedilo da proces proizvede željeni kvalitet.

Razvoj procesa usko je povezan sa razvojem formulacije i ne može se posmatrati odvojeno (Yu, 2008; Trivedi, 2012; Yu, 2012), a takođe je i sam kompleksan jer se sastoji od niza pojedinačnih operacija. Prema, Lionberger i sar., 2008 izdvojene su četiri kategorije parametara i atributa, čiji međusobni uticaji moraju biti sagledani pri definisanju kritičnih parametara procesa:

- atributi ulaznih materijala (*input material attributes*)
- atributi izlaznih materijala (*output material attributes*)
- ulazni radni parametri (*input operating parameters*)
- izlazni uslovi stanja procesa (*output process state conditions*)

Pri tome se ulazni radni parametri tretiraju kao faktori sa direktnim, dok su izlazni uslovi stanja procesa parametri sa indirektnim uticajem na proces i kritične parametre procesa:

***Faktori sa direktnim uticajem na definisanje parametara procesa***

- *Tip opreme*
- *Podšavanje opreme*
- *Veličina serije*
- *Proizvodni uslovi (vreme, temperatura, pritisak, pH, brzina)*
- *Ambijentalni uslovi (temperatura, relativna vlaga)*

***Faktori sa indirektnim uticajem na definisanje parametara procesa***

- *Održavanje opreme*
- *Obuka operatera*
- *Standardne operativne procedure SOPs koje se odnose na proizvodnju specifičnih proizvoda*
- *Procesni fluidi i sistemi*

Atributi ulaznih i izlaznih materijala u zavisnosti od zahteva farmaceutskog oblika mogu biti sa direktnim ili indirektnim uticajem (Yu, 2012).

Tabela 1.4. Pregled potencijalnog odnosa farmaceutskih operacija, parametara procesa i atributa kvaliteta kod proizvodnje čvrstih lekovitih oblika, (Yu, 2008)

<i>Farmaceutske operacije</i>	<i>Potencijalni parametar procesa</i>	<i>Potencijalni atribut kvaliteta</i>	
<i>Mešanje</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tip i geometrija miksera</li> <li>• Redosled dodavanja komponenata</li> <li>• Nivo punjenosti miksera</li> <li>• Broj rotacija (vreme i brzina)</li> <li>• Agitacija (on / off pozicija)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uniformnost mase</li> <li>• Veličina i distribucija veličine čestica / granulata</li> <li>• Nasipna / sabijna gustina</li> <li>• Sadržaj vlage</li> <li>• Protočnost</li> </ul>	
<i>Vlažna Granulacija</i>	<p><b>Visoko smicajni mikser:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vreme mešanja pre dodavanja vezivnog sredstva</li> <li>• Mešač: brzina, geometrija, položaj</li> <li>• Sekač: brzina, geometrija</li> <li>• Mlaznice: tip, položaj</li> <li>• Vezivno sredstvo: način dodavanja, količina</li> <li>• Rastvor vezivnog sredstva: temperatura, brzina, vreme dodavanja</li> <li>• Vreme domešavanja</li> <li>• Temperatura u mešaču</li> </ul>	<p><b>Fluidna sušnica/granulator:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vreme mešanja</li> <li>• Tip, broj, veličina otvora, oblik raspršivanja mlazn</li> <li>• Vezivno sredstvo: način Dodavanja, količina</li> <li>• Rastvor vezivnog sredstva: temperatura, brzina, vreme dodavanja, količina</li> <li>• Ulazni vazduh: brzina protoka, volumen, temperatura</li> <li>• Izlazni vazduh: brzina protoka, temperatura</li> <li>• Filteri: kvalitet, promer otvora, intervali otresanja</li> <li>• Temperatura proizvoda</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uniformnost mase</li> <li>• Protočnost</li> <li>• Sadržaj vlage</li> <li>• Veličina i distribucija veličine čestica / granulata</li> <li>• Friabilnost granula</li> </ul>
<i>Sušenje</i>	<p><b>Fluidna sušnica</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ulazni vazduh: brzina protoka, volumen, temperatura</li> <li>• Izlazni vazduh: brzina protoka, temperatura</li> <li>• Filteri: kvalitet, promer otvora, intervali otresanja</li> <li>• Proizvod: temperatura</li> <li>• Ukupno vreme sušenja</li> </ul>	<p><b>Etažna / komorna sušnica</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Broj etaža / polica po komori,</li> <li>• Količina granulata po polici,</li> <li>• Temperatura i vreme sušenja</li> <li>• Protok vazduha</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Veličina i distribucija veličine čestica / granulata</li> <li>• Friabilnost granula</li> <li>• Protočnost</li> <li>• Nasipna / sabijna gustina</li> <li>• Sadržaj vlage</li> <li>• Rezidui rastvarača</li> </ul>
<i>Tabletiranje</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Komprimovanje: brzina, pritisak,</li> <li>• Sila pre kompresije</li> <li>• Punjač: geometrija, brzina</li> <li>• Levak: geometrija, visina, vibracije</li> <li>• Tablete: težina, debljina</li> <li>• Dubina punjenja</li> <li>• Dubina ulaska štifta</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uniformnost mase</li> <li>• Uniformnost sadrž.</li> <li>• Čvrstina</li> <li>• Debljina</li> <li>• Poroznost tableta</li> <li>• Friabilnost</li> <li>• Vizuelni atributi</li> <li>• Sadržaj vlage</li> <li>• Raspadljivost,</li> <li>• Brzina rastvaranja</li> </ul>	
<i>Suva granulacija rolerom</i>	<p><b>Suvi granulator</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Brzina</li> <li>• Rastojanje do rolera,</li> <li>• Pritisak rolera</li> <li>• Tip rolera</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Izgled,</li> <li>• Veličina i oblik čestic,</li> <li>• Gustina, debljina, jačina komprimata</li> </ul>	

Tabela 1.4.(nastavak tabele) Pregled potencijalnog odnosa farmaceutskih operacija, parametara procesa i atributa kvaliteta kod proizvodnje čvrstih lekovitih oblika, (Yu, 2008)

<i>Farmaceutske operacije</i>	<i>Potencijalni parametar procesa</i>	<i>Potencijalni atribut kvaliteta</i>
<b>Oblaganje (u fluidnom sloju, koateru)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Proizvod: temperatura</i></li> <li>• <i>Predzagrevanje: temperatura</i></li> <li>• <i>Mlaznice: tip, broj, veličina otvora, oblik raspršivanja,</i></li> <li>• <i>Mlaznice: pojedinačna brzina rasprš.</i></li> <li>• <i>Ukupna brzina raspršivanja</i></li> <li>• <i>Bubanj: brzina okretanja</i></li> <li>• <i>Pritisak raspršivanja</i></li> <li>• <i>Ulazni vazduh: brzina protoka, temperatura, dew point</i></li> <li>• <i>Izlazni vazduh: brzina protoka, temperatura</i></li> <li>• <i>Proizvod: temperatura</i></li> <li>• <i>Ukupno vreme oblaganja</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Masa obloženih tableta</i></li> <li>• <i>Izgled</i></li> <li>• <i>Vizuelni atributi</i></li> <li>• <i>Procentualno povećanje mase jezgra</i></li> <li>• <i>Debljina filma</i></li> <li>• <i>Uniformnost boje filma</i></li> <li>• <i>Čvrstina</i></li> <li>• <i>Debljina</i></li> <li>• <i>Sadržaj vlage</i></li> <li>• <i>Raspadljivost,</i></li> <li>• <i>Brzina rastvaranja</i></li> </ul>
<b>Mlevenje</b>	<p><b><i>Mlinovi sa sitom</i></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Tip mlina</i></li> <li>• <i>Brzina</i></li> <li>• <i>Konfiguracija sekača i tip</i></li> <li>• <i>Veličina i tip sita</i></li> <li>• <i>Brzina punjenja</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Veličina i distribucija veličine čestica</i></li> <li>• <i>Oblik čestica</i></li> <li>• <i>Polimorfni oblik</i></li> <li>• <i>Protočnost</i></li> <li>• <i>Nasipna / sabijna Gustina</i></li> </ul>

Zavisnost primenjenih operacija i njihovih parametara procesa na kritične attribute kvaliteta proizvoda je vrlo brojna i složena, i učinjen je pokušaj da se sistematizuju i prikažu svi potencijalni parametri procesa i atributi kvaliteta u sličaju proizvodnih operacija kod čvrstih oblika (Yu, 2008), što je prikazano tabelom 1.4.

Pošto svi parametri procesa nemaju jednak uticaj na kritične attribute kvaliteta gotovog proizvoda, prema FDA klasifikovani su u tri kategorije (Lionberger i sar., 2008) na osnovu stepenu kritičnosti, tabela 1.5.

Na početku razvojne faze, kada se raspolaze samo literaturnim podacima, praktično svi procesni parametri su statusa neklasifikovani. Uz pomoć procene rizika procesa sprovodi se prva selekcija neklasifikovanih parametara, i izdvajaju parametri za potencijalna eksperimentalna ispitivanja. Na osnovu eksperimentalnih rezultata status procesnih parametara se menja u kritičan / ne-kritičan ili i dalje ostaje neklasifikovan.

Tabela 1.5. Klasifikacija parametara procesa, (Lionberger i sar., 2008)

<i>Parametar</i>	<i>Klasifikacija</i>	<i>Opis</i>
<b>Neklasifikovani parametar procesa</b> <i>Unclassified process parameter</i> <i>UPP</i>	Kritičnost nije poznata	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uticaj na druge parametre nije utvrđen</li> <li>• Vežan za početak razvojne faze i odsustvo eksperimentalnih rezultata</li> </ul>
<b>Ne-kritični parametar procesa</b> <i>Non-critical process parameter</i> <i>non-CPP</i>	Nije kritičan	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neće uzrokovati promene kod ciljanog profila kvaliteta proizvoda (QTPP) ili u potencijalnom radnom prostoru (POS)</li> <li>• Interakcije sa drugim parametrima u odobrenom prihvatljivom opsegu (PAR) se ne očekuju</li> </ul>
<b>Kritični parametar procesa</b> <i>Critical process parameter</i> <i>CPP</i>	Kritičan (kontrola neophodna da bi se obezbedio kvalitet)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Može uzrokovati promene kod ciljanog profila kvaliteta proizvoda (QTPP) ili u potencijalnom radnom prostoru (POS)</li> <li>• Interakcije sa drugim parametrima u odobrenom prihvatljivom opsegu (PAR) se mogu očekivati</li> </ul>

Za potrebe klasifikacije parametara procesa / operacija, uvedena su tri termina:

**Potencijalni radni opseg (prostor)** (*Potential Operating Space, POS*), je potencijalni radni opseg parametra, ustanovljenih minimalnih i maksimalnih granica, prihvatljivih za uspešno izvođenje procesa (Lionberger i sar., 2008).

**Potvrđen prihvatljiv opseg** (*Proven Acceptable Rang, PAR*), EMA, ICH Q8(R2), 2009 je potvrđeni opseg parametra procesa unutar koga će primenjenom operacijom biti proizveden materijal zahtevanih kriterijuma prihvatljivosti, pod uslovom da su ostali parametri procesa održavani konstantnim.

**Normalni radni opseg** (*Normal Operating Range, NOR*), je unutar PAR i predstavlja rutinsku kontrolu parametara u toku proizvodnje kako bi se obezbedila reproduktivnost (Jiang i Yu, 2009). Prema FDA najpre se definiše POS, potom se proverava eksperimentalno, a na osnovu dobijenih rezultata postavlja PAR i NOR. POS nije preporučljivo da bude postavljen sa preširokim granicama jer se u toku eksperimenata može ustanoviti da je "lažno kritičan", a takođe se mora uskladiti i sa mernim opsegom instrumenata.

U toku razvoja procesa i kritičnih parametara procesa potrebno je potvrditi: robustnost, reproduktivnost i konzistentnost (Yu LX., 2008) procesa.

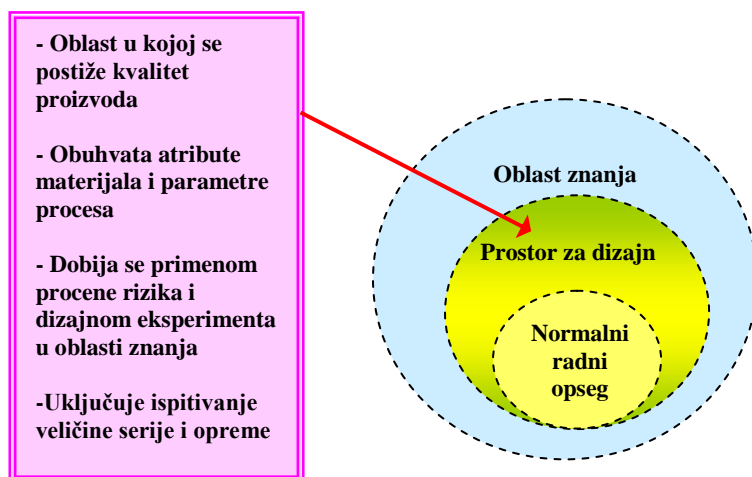
**Robustnost procesa** (*Process Robustness*), Glodek i sar., 2006; EMEA, ICH Q8(R2), 2009; Patil, 2010, je sposobnost procesa da toleriše raznolikosti koje se javе kod materijala, u radnim uslovima, na procesnoj opremi, u ambijentalnim uslovima, zbog ljudskog faktora, a bez negativnog uticaja na kvalitet proizvoda, predstavlja ključni zahtev svakog procesa, a najčešće se opisuje preko indeksa kapaciteta (sposobnosti)

procesa (*Process Capability Index*, CpK). Indeks kapaciteta procesa predstavlja statističku meru variranja procesa i poželjno je da je značajno veći od 1.

#### 1.1.2.4. Prostor za dizajn

**Prostor za dizajn** (*Design Space*), EMA, ICH Q8(R2, 2009), je multidimenzionalna kombinacija i interakcija između ulaznih promenljivih (npr. atributi materijala) i parametara procesa koja treba da pokaže da je obezbeđena sigurnost u pogledu kvaliteta. Rad unutar prostora za dizajn ne smatra se promenom; kretanje van dizajniranog prostora se smatra promenom i zahteva pokretanje postregistracionih promena. Prostor za dizajn predlaže istraživač a predmet je procene i odobrenja od strane regulatornih organa.

Prostor za dizajn počinje da se razvija već u konceptualnoj fazi razvoja, ali se sukcesivno unapređuje kroz celi životni ciklus proizvoda (Lepore, 2008), kako se dodatne informacije i znanja generišu (Garcia i sar., 2008) i zavisi od poznavanja proizvoda i definisane veličine serije, procesa i tipa opreme, a direktno je povezan sa konceptom dizajna kvaliteta i parametrima kao što su: kritičnost, strategija kontrole, normalni radni opseg, što je prikazano na slici 1.3. (Garcia i sar., 2008; Lepore, 2008).



Slika 1.3. Prostor za dizajn i njegova povezanost sa normalnim radnim opsegom, (Garcia i sar., 2008; Lepore, 2008)

Granice prostora za dizajn zasnivaju se na parametrima datim u okviru ciljanog profila kvaliteta proizvoda pošto on identifikuje i opisuje željeni profil proizvoda, sa aspekta efikasnosti i bezbednosti proizvoda (Lepore, 2008; Berridge, 2009). Veličina serije i tip opreme imaju direktan uticaj, tako da se prostor za dizajn definisan na laboratorijskom



nivou treba proveriti na serijama koje po veličini odgovaraju proizvodnim ili setom ispitivanja pokazati da nije šaržno zavistan (Teivedi, 2012). Prostor za dizajn može biti uspostavljen za jednu operaciju, više jediničnih operacija ili ceo proces (Yu., 2008; Lepore, 2008). Kritičnost određuje za koje attribute kvaliteta i procesne parametre treba definisati prostor za dizajn.

Prostor za dizajn definiše vezu između CQAs i CPPs i predviđa prihvatljive radne opsege za CPPs u okviru kojih se dobija prihvatljiv proizvod.

Normalni radni opseg, koji se još naziva i **prostor za kontrolu**, *Control space*, je deo unutar prostora za dizajn gde se rutinska proizvodnja može odvijati na dnevnom nivou.

Strategija kontrole obezbeđuje da se odvijanje procesa održava unutar prostora za dizajn.

#### **1.1.2.5. Strategija kontrole i upravljanje životnim ciklusom proizvoda**

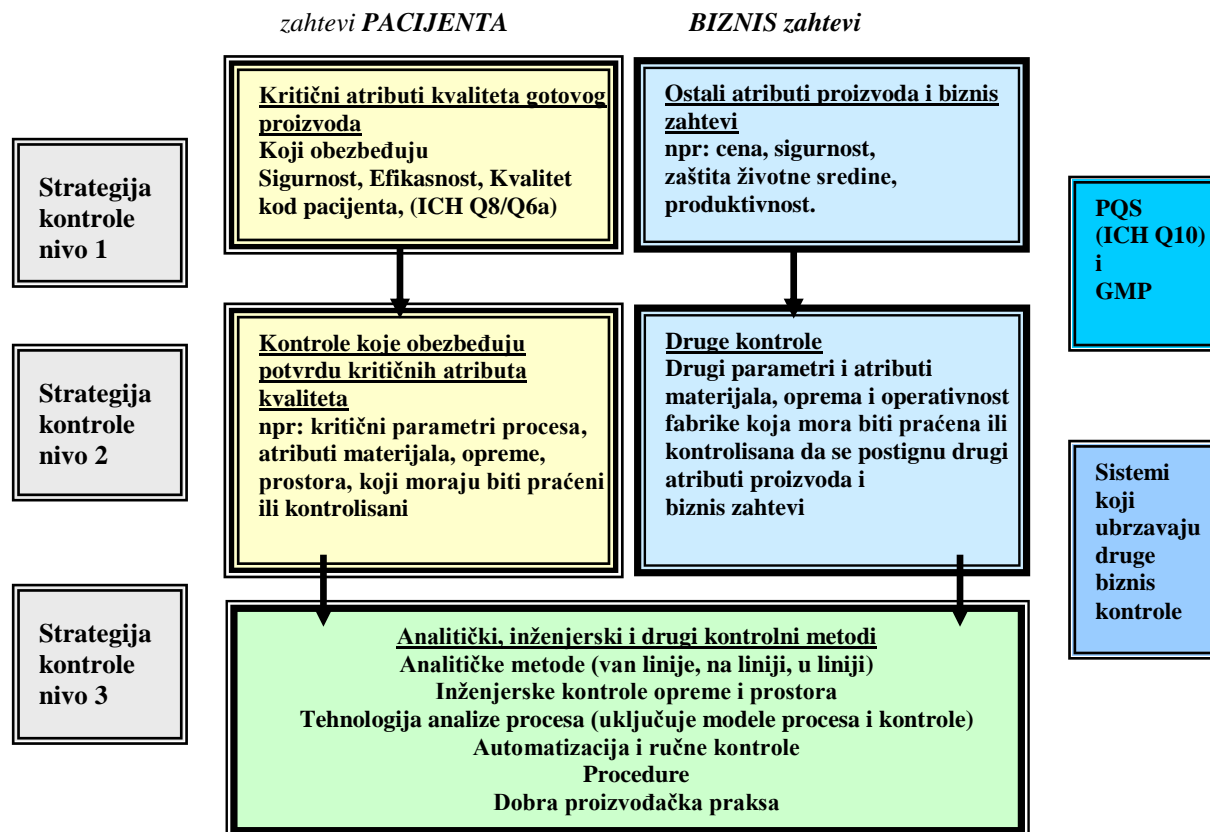
**Strategija kontrole** (*Control Strategy*), EMA, ICH Q8(R2, 2009, je planirani skup kontrola, izveden iz trenutnog poznavanja proizvoda i procesa, koje treba da obezbede uspešno izvođenje procesa i dobijanje kvalitetnog proizvoda. Kontrole mogu da obuhvate parametre i attribute koji se odnose na lekovitu supstancu i ekscipijense u sastavu gotovog proizvoda, prostor i uslove za rad opreme, in-procesnu kontrolu, specifikaciju gotovog proizvoda, i pridružene metode i frekvence praćenja i kontrole.

Prema ICH Q8(R2) razlikuje se minimalni (kvalitet gotovog proizvoda se prati prvenstveno preko kontrole međuproizvoda i kroz završno testiranje) i pojačani pristup uspostavljanja strategije kontrole (preko analize rizika i pomeranjem kontrole kvaliteta na puštanje u realnom vremenu ili uz smanjen obim završnog testiranja).

Kako bi se postiglo kontinuirano unapređenje kvaliteta proizvoda u toku celog životnog ciklusa, tim za unapređenje strategije kontrole, predložio je model kojim bi se ubrzala komunikacija, razumevanje i implementiranje strategije kontrole, slika 1.4., (Davis i sar., 2008; Garcia, 2008).

**Strategija kontrole nivoa 1**, identifikuju se kritični atributi kvaliteta gotovog proizvoda koji imaju uticaj na sigurnost, efikasnost i kvalitet kod pacijenta, izvode se iz ciljanog profila kvaliteta proizvoda, na osnovu prethodnog znanja, kliničkih rezultata i trenutnih saznanja o proizvodu i procesu. Identifikuju se i biznis zahtevi: cena koštanja, operativnost procesa, zaštita životne sredine. Primenom različitih metodologija analize

rizika (HACCP, FMEA) proverava se stepen kritičnosti izdvojenih parametara (Davis i sar, 2008).



Slika 1.4. Model strategije kontrole, definisan od strane tima za unapređenje strategije kontrole (Davis i sar., 2008; Garcia, 2008)

**Strategija kontrole nivoa 2**, na osnovu analizirane kritičnosti definiše koji od parametara izdvojenih u toku nivoa 1 (procesnih parametara, atributa materijala i drugih komponenata) mora biti praćen ili kontrolisan pošto utiče na kvalitet proizvoda.

**Strategija kontrole nivoa 3**, u toku ove faze, analitičke i druge metode kontrole se opisuju. Utvrđuju se: tehnike merenja za attribute materijala i parametre opreme (van linije, povezan na liniji, integrisan u liniju); univarijantni i multivarijantni procesni i kontrolni modeli; procedure i inženjerske kontrole pogona uključujući sisteme automatizacije, zatvorene kontrolne lupove, normalne radne opsege i alarme.

Klasifikacija procesnih parametara na kritične i nekritične, je suštinska (Lionberger i sar., 2008) za razvoj strategije kontrole i što je više parametara klasifikovano, smanjuje se potreba za krajnjim testiranjem proizvoda (*end product testing*), tabela 1.6.

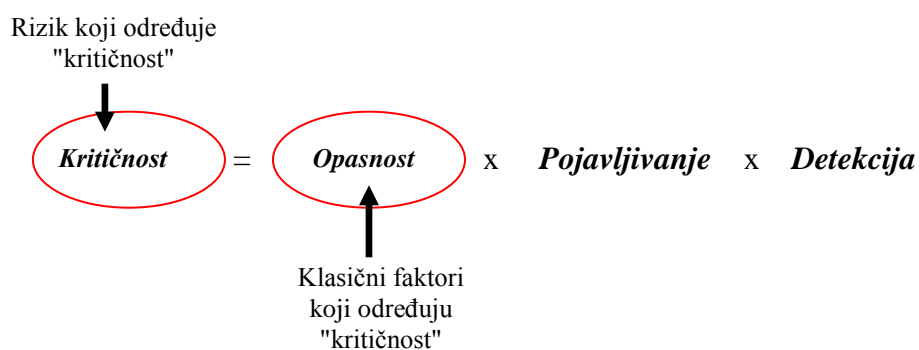
Tabela 1.6. Odnos klasifikacije procesnih parametara i strategije kontrole (Lionberger i sar., 2008)

<i>Parametar</i>	<i>Potencijalna kontrolna strategija</i>
<b>Neklasifikovani parametar procesa</b> <i>Unclassified process parameter</i> <i>UPP</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pojačano testiranje pri puštanju zbog nepoznate kritičnosti</li> <li>• Vrednosti parametara procesa fiksirane na vrednosti dobijene pri ispitivanju serija, ili na uski opseg (mora se testirati u validaciji) kako bi se osiguralo da nema interakcija</li> </ul>
<b>Nekritični parametar procesa</b> <i>Non-critical process parameter</i> <i>non-CPP</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Monovarijantni opseg u proizvodnim kartama</li> <li>• Pod kontrolom sistema kvaliteta proizvođača</li> </ul>
<b>Kritični parametar procesa</b> <i>Critical process parameter</i> <i>CPP</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Smanjuje se obim testiranja pri puštanju kada su svi kritični parametri procesa identifikovani, praćeni i kontrolisani</li> <li>• Potvrđen prihvatljiv opseg ukoliko nema podataka o multivarijetnim interakcijama</li> <li>• Prostor za dizajn da dozvoli multivarijetne promene</li> <li>• Povratna kontrola zasnovana na merenju atributa materijala</li> </ul>

### 1.1.2.6. Kritičnost i principi definisanja kritičnosti

Kritičnost, je pored strategije kontrole i prostora za dizajn, od suštinskog značaja za implementiranje koncepta dizajna kvaliteta i definiše parametre i attribute koji trebaju biti uključeni u prostor za dizajn (Garcia, 2008). Kritičnost se koristi da deklarise: attribute materijala, svojstva ili karakteristike lekovite supstance, ulaznih materijala, ostalih komponenata, gotovog proizvoda, attribute procesa, parametre odnosno uslove u proizvodnji gotovog proizvoda, na kritične ili nekritične posmatrano u odnosu na sigurnost, efikasnost i kvalitet gotovog proizvoda (Garcia, 2008).

Procena kritičnosti (Nosal i Schultz, 2008) je funkcija izmerene procene rizika, koja se sastoji od više elemenata (Slika 1.5).



Slika 1.5. Elementi procene kritičnosti (Nosal i Schultz, 2008)

Stablo odlučivanja kod analize kritičnosti (*Criticality Analysis Decision Tree*), slika 1.6., je nezvanični predlog procene rizika kojim se promenljive (atributi i parametri) mogu kategorisati / svrstavati. Promenljive sa potencijalnim direktnim uticajem na bezbednost, efikasnost, kao i kvalitet se izdvajaju od onih promenljivih koje zavise od poslovnih kriterijuma ili efikasnosti procesa (Nosal i Schultz, 2008; Garcia i sar. 2008). Stablo odlučivanja kod analize kritičnosti je primenljivo za lekovite supstance, gotove proizvode, biološke proizvode, medicinska sredstva i procese.

***Nekritični atributi, parametri i ostale promenljive*** se smatraju oni kod kojih je bilo dokazano ili na osnovu prethodnog znanja poznato da nemaju potencijalni uticaj na bezbednosti i / ili efikasnost proizvoda. Nekritične promenljive ne predstavljaju rizik jer nisu funkcionalno povezani sa kritičnim atributima kvaliteta i u skladu sa ICH Q8(R2) ne moraju biti uključene u opis prostora za dizajn.

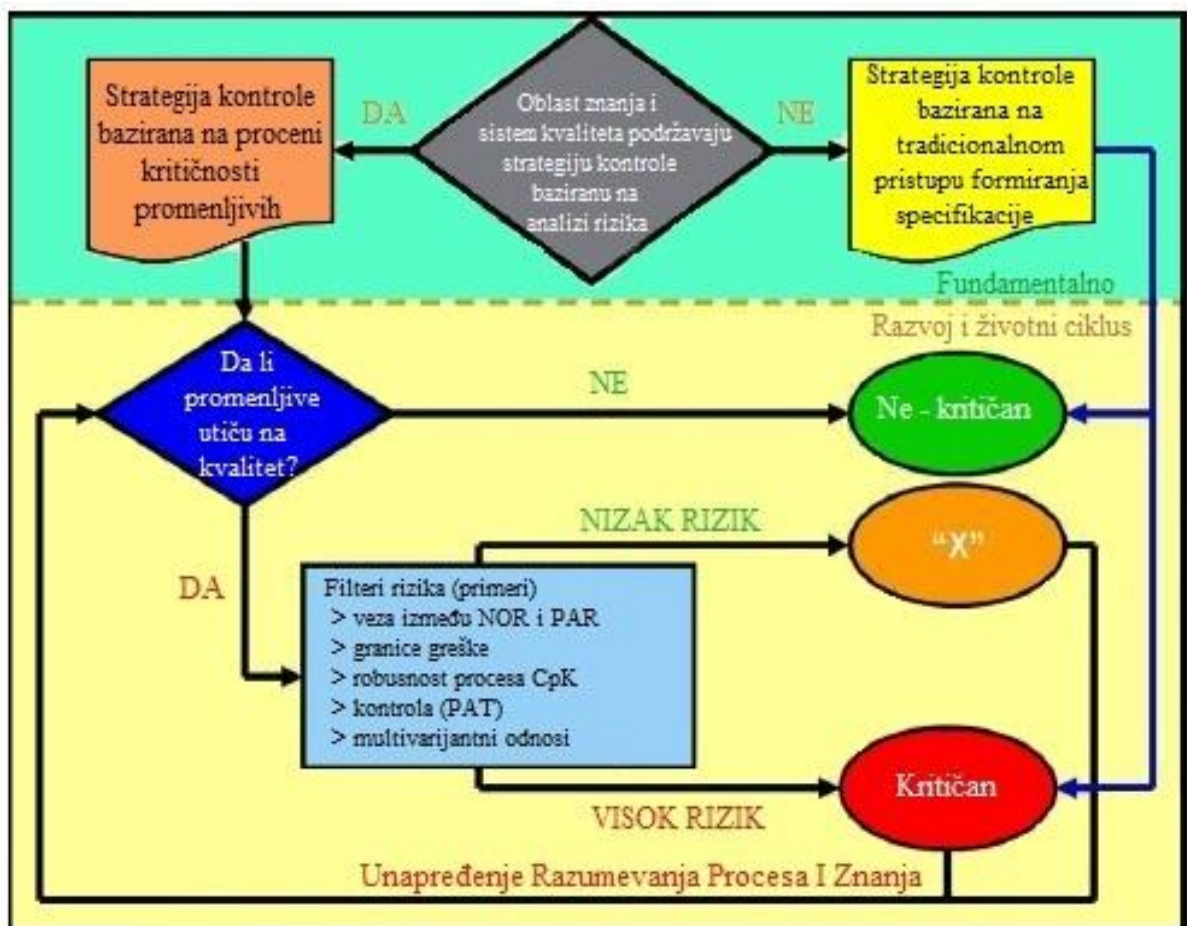
***Neklasifikovani atributi, parametri i ostale promenljive*** označeni sa " X " odnose se na sve promenljive koje su pokazale, ili se na osnovu prethodnog znanja, sumnja da imaju potencijalni uticaj na kvalitet proizvoda i za koje je nivo rizika ocenjen kao nizak; za promenljive koje mogu imati posredan uticaj na bezbednost i / ili efikasnost sami ili u kombinaciji sa drugim promenljivim.

Atributi, parametri ili promenljive u ovoj kategoriji mogu funkcionalno biti vezani za kritične attribute kvaliteta. Njihova kritičnost se ponovo procenjuje u slučaju uvođenja promena u proizvodni proces.

***Kritičnim su kategorisani atributi materijala, procesa ili parametri*** za koje je pokazano ili na osnovu prethodnog znanja poznato, da imaju direktan ili indirektan uticaj na bezbednost pacijenta, terapijsku efikasnost, *in vivo* farmakokinetičke ili farmakodinamske karakteristike kao i potvrdu da neuspeh njihove kontrole i održavanja u okviru zadatih kriterijuma prihvatljivosti proizvodi rizik po pacijenta.

Kritičnim procesnim parametrom se smatra parametar koji kada varira izvan ograničenog opsega, ima direktan i značajan uticaj na kritične attribute kvaliteta gotovog proizvoda.

Kritičnim atributom kvaliteta smatra se parametar međuproizvoda ili gotovog proizvoda koji utiče na postizanje čistoće, efikasnosti i sigurnosti gotovog proizvoda.

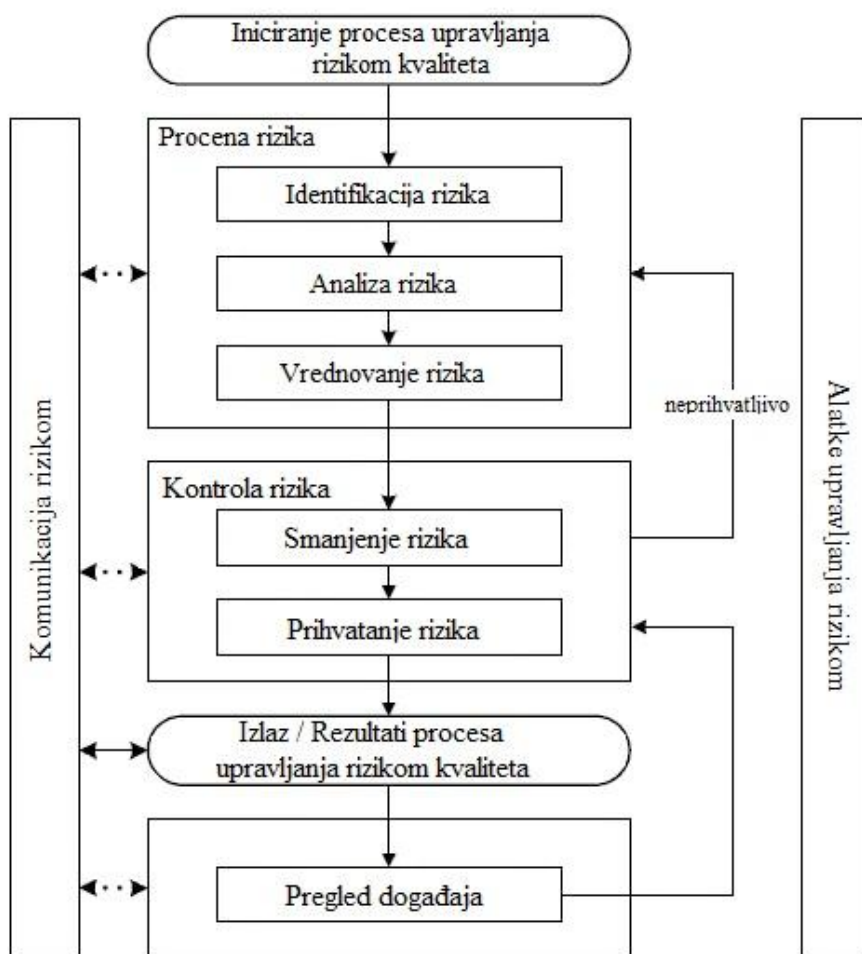


Slika 1.6. Stablo odlučivanja kod procene kritičnosti, (Nosal i sar., 2008)

### 1.1.3. METODOLOGIJA PROCENE RIZIKA

**Upravljanje rizikom kvaliteta** (*Quality Risk Management, QRM*), EMA, ICH Q9 2011, je sistematski proces procene, kontrole, komunikacije i pregleda rizika kvaliteta lekovitih proizvoda u toku njihovog celog životnog ciklusa.

**Procenu rizika** (*Risk assesment*), EMA definiše kao sistematski proces organizovanja informacija da bi se podržalo donošenje odluke o riziku u okviru procesa upravljanja rizikom.



Slika 1.7. Dijagram toka upravljanja rizikom (EMA, ICH Q9, 2011)

**Rizik** (*Risk*) se definiše kao kombinacija verovatnoće pojavljivanja štetnog događaja i ozbiljnosti štete (EMA, ICH Q8(R2) 2009; EMA, ICH Q9, 2011).

Procena rizika sastoji se od identifikacije opasnosti, analize i procene rizika u vezi sa izlaganjem tim opasnostima, Slika 1.7.

Prema Aneksu 2, EMA ICH Q9, procena rizika se treba primeniti u sledećim oblastima farmaceutske industrije: upravljanju kvalitetom, regulatornim aktivnostima, na opremi, prostorima i sistemima, kod upravljanja materijalima, u proizvodnji, u laboratorijskoj kontroli i ispitivanju stabilnosti, na pakovanju i etiketiranju, u razvoju novog proizvoda i procesa; kao i u sledećim fazama životnog ciklusa proizvoda: u toku razvoja, periodično u ključnim trenucima životnog ciklusa proizvoda, u slučaju kontrola izmena na proizvodu ili procesu.

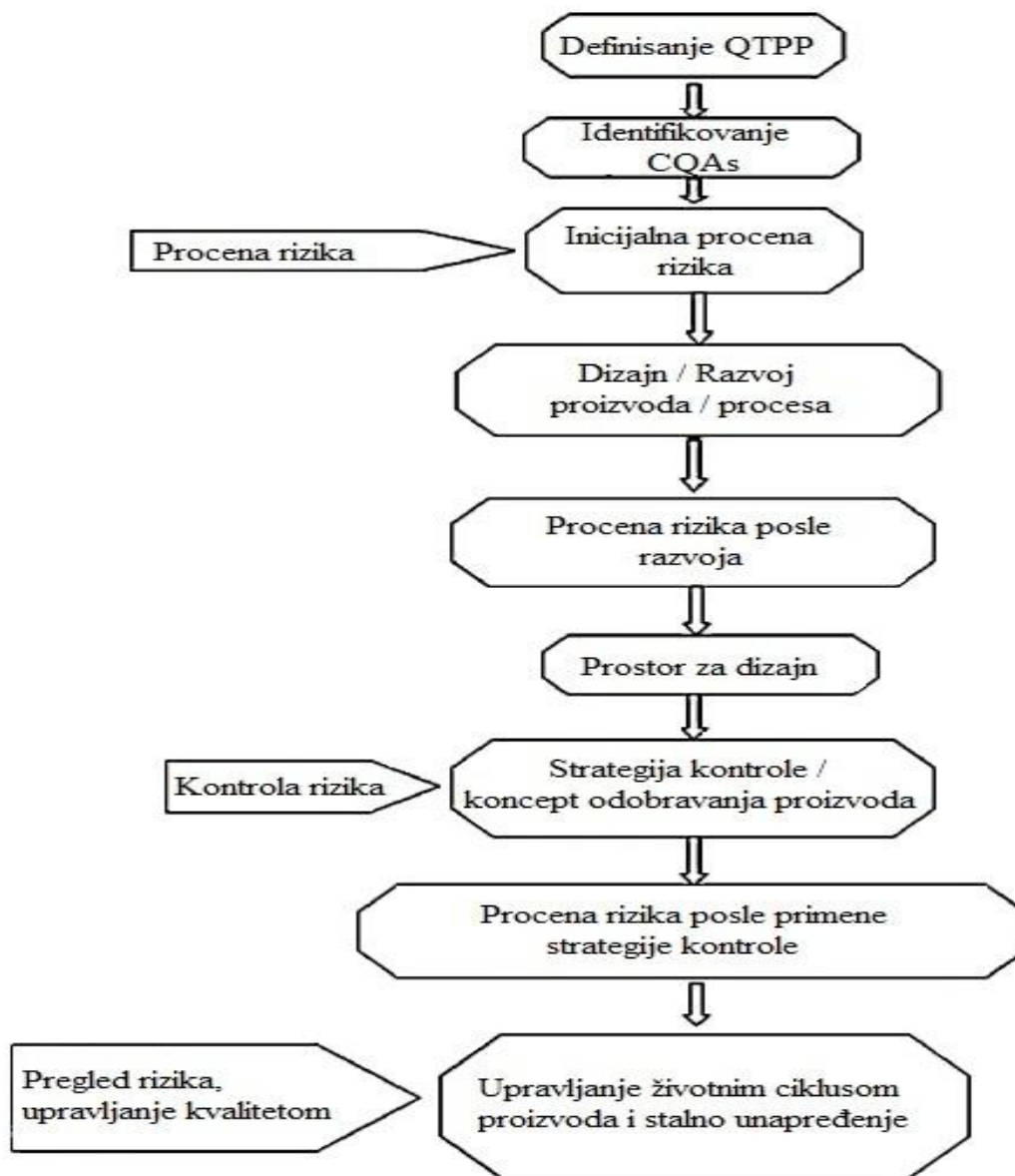
#### **1.1.3.1. Procena rizika u službi koncepta dizajna kvaliteta**

Sušтина koncepta dizajna kvaliteta je ugradnja kvaliteta u proizvod od samog početka, a uz pomoć tehnike analize rizika.

Prema EMA, ICH Q8(R2) 2009, osnovni cilj primene upravljanja rizikom kvaliteta u razvoju novog proizvoda, je identifikovanje atributa materijala i parametara procesa koji utiču na kritične attribute kvaliteta gotovog proizvoda.

U fazi razvoja proizvoda procena rizika se sprovodi u sledećim momentima (EMA, ICH Q9, 2011; Charoo i sar., 2012), slika 1.8.:

- ***u ranoj fazi pri dizajniranju kvaliteta proizvoda i proizvodnog procesa*** (inicijalna procena rizika), kada se još uvek ima ograničen broj informacija, a na osnovu postavljenog koncepta ciljanog profila proizvoda TPP.
- ***u daljim fazama razvoja proizvoda, kada dolazi do promena u prostoru za dizajn ili se prikupi značajan broj naučnih saznanja***, što može podrazumevati: procenu kritičnosti atributa ulaznih materijala, rastvarača, API, ekscipijenasa, pakovnih materijala; uspostavljanje odgovarajuće specifikacije; identifikovanje CPP; uspostavljanje zahteva kontrole procesa; procena potrebe za dodatnim ispitivanjima (bioekvivalencija, stabilnost) u fazi scale up ili transfera proizvoda; kod uspostavljanja adekvatnog prostora za dizajn,



\*QTPP- Ciljani Profil Kvaliteta Proizvoda  
 \*\*CQAs- Kritični Atributi Kvaliteta

Slika 1.8. Ključne tačke analize rizika u toku razvoja proizvoda, (Charoo i sar., 2012)



U tabeli 1.7. dat je pregled preporučenih tehnika procene rizika prema EMA ICH Q9.

Tabela 1.7. Pregled preporučenih tehnika procene rizika i oblasti primene, prema EMA ICH Q9

<i>Preporučene tehnike procene rizika</i>	<i>Preporučene oblasti primene:</i>
<b>Analiza efekata u sličaju ne izvršenja</b> <i>Failure Mode Effects Analysis (FMEA)</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• kod proizvodnih operacija i njihovog uticaja na proizvod ili proces</li> <li>• kod proizvodne opreme,</li> <li>• kod proizvodnog prostora,</li> <li>• kod razvojne faze formulacije i procesa,</li> </ul>
<b>Analiza efekata i kritičnosti u sličaju ne izvršenja</b> <i>Failure Mode, Effects and Criticality Analysis (FMECA)</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• u farmaceutskoj industriji pri analizi rizika /grešaka povezanih sa proizvodnim procesom,</li> <li>• kada je potrebno prikazati relativni "zbit" rizika, za svaku analiziranu grešku/ neuspeh,</li> </ul>
<b>Analiza stabla nedostataka</b> <i>Fault Tree Analysis (FTA)</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• za sagledavanje moguće greške kod procesa ili proizvoda, ili identifikovanje mogućih korena uzroka greške,</li> <li>• pri preispitivanju žalbi / devijacija, radi objašnjenja koren uzroka devijacije, i potvrde da nameravana poboljšanja u potpunosti rešavaju problem, bez otvaranja novih kritičnih mesta,</li> <li>• pri proceni rizika u toku razvoja programa praćenja (monitoring programs) sistema / prostora</li> </ul>
<b>Analiza rizika i kritične kontrolne tačke</b> <i>Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP)</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pri ispitivanju, sprečavanju i kontroli rizika ili neželjenih posledica, uzrokovanih dizajnom, razvojem, u toku proizvodnje ili upotrebe proizvoda,</li> <li>• pri identifikovanju i upravljanju rizicima povezanim sa fizičkom, hemijskom, biološkom, mikrobiološkom opasnosti,</li> <li>• pri identifikovanju kritičnih kontrolnih tačaka,</li> <li>• radi procesa praćenja kritičnih tačaka, u toku proizvodnje kao i ostalih životnih faza proizvoda,</li> </ul>
<b>Studija izvodljivosti u slučaju opasnosti</b> <i>Hazard Operability Analysis (HAZOP)</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• kod proizvodnog procesa, opreme i prostora</li> <li>• pri analizi rizika bezbednosti procesa</li> </ul>
<b>Preliminarna analiza opasnosti</b> <i>Preliminary Hazard Analysis (PHA)</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• u ranoj fazi dizajna procesa, prostora</li> <li>• u ranoj fazi razvoja proizvoda procesa, kada se raspolaže malom količinom podataka,</li> <li>• kod analize postojećih sistema,</li> </ul>

Procenjeni rizik, može biti kategorisan kao:

- I. Prihvatljiv rizik** - dalja istraga nije opravdana
- II. Potencijalni rizik** - dalja istraga je opravdana
- III. Značajan rizik** - definisanje strategije upravljanja rizikom se zahteva
- IV. Neprihvatljiv rizik** - nastaviti analizu, reformulisati proizvod / proces, odustati od takvog proizvoda / procesa

**Prihvatljiv rizik** – je kada se utvrdi da neke ulazne promenljive nemaju značajan uticaj na kvalitet proizvoda (nizak nivo opasnosti i verovatnoće), i nisu potrebna dodatna eksperimentalna ispitivanja tih parametara, u okviru daljeg razvojnog programa.

**Potencijalni rizik** – kada se utvrdi da promenljive pokazuju visok nivo opasnosti, nisku verovatnoću i nizak ili visok nivo detekcije, tako da mogu imati uticaj na kvalitet proizvoda. Moguće je preduzeti sledeće korake: redizajn proizvoda / procesa, kako bi se rizik eliminisao; utvrditi da li je moguće uspostaviti prihvatljivu strategiju kontrole kako bi se postigla robustna proizvodnja, uprkos kritičnog uticaja na kvalitet; sprovesti dodatne eksperimente kako bi se postiglo bolje upoznavanje rizika;

Redizajn proizvoda / procesa, poseduje i svoju neželjenu stranu, jer se rešavanjem jednog problema može stvoriti novi. Ako se pristupa detaljnijem opisu potencijalnog rizika, dalja ispitivanja mogu pokazati da se rad obavlja u relativno širokom prostoru za dizajn, te ne predstavlja veliki rizik za proizvod, da operacije spadaju u prihvatljivu kategoriju rizika.

**Značajan rizik** – je kada se kod promenljivih utvrdi uticaj na kvalitet proizvoda (visok nivo opasnosti, dok nivo verovatnoće može biti nizak ili visok u zavisnosti od tipa promenljivih i stepena kontrole procesa), te iste zahtevaju pažljivu kontrolu kako bi se obezbedio prihvatljiv kvalitet proizvoda. Parametri ove kategorije rizika učestvuju u formiranju konačne strategije kontrole. Već u ranoj fazi razvoja, više ulaznih promenljivih pripašće ovoj kategoriji, jer se ne raspolaže dovoljnom količinom znanja i eksperimentalnih rezultata da bi se precizno odredio nivo rizika. Razvoj se može usmeriti na optimizaciju proizvoda / procesa, sa ciljem postavljanja ulaznih parametara u prihvatljive kategorije rizika putem uspostavljanja šireg prostora za dizajn ili odgovarajuće strategije kontrole.

**Neprihvatljiv rizik** – je kada se prevazilazi nivo prihvatljivog rizika po pacijenta, pa se mora doneti odluka o nastavku / prekidu razvoja proizvoda, redizajniranju procesa/proizvoda. Ukoliko se pristupi redizajnu, potrebno je ponoviti inicijalnu procenu rizika kod kreirane nove formulacije.

Primeri matrice procene rizika uticaja sastava formulacije (tabela 1.8.), procesa vlažne granulacije (tabela 1.9.) i direktne kompresije (tabela 1.10.) na kritične attribute kvaliteta tableta sa trenutnim oslobađanjem su prikazani tabelarno od strane Advisory Committee for Pharmaceutical Science, pri FDA i EMA (Koranianiti, 2011; Yu, 2012).

Tabela 1.8. Procena rizika uticaja sastava formulacije na kritične atribute kvaliteta tableta sa trenutnim oslobađanjem, (Yu, 2012)

Kritični atributi kvaliteta gotovog proizvoda	Atributi Formulacije				
	Aktivna supstanca veličina čestica	Punilac (Laktoza)	Punilac, (skrob)	Sredstvo za raspadanje, (celuloza), Veličina čestica	Sredstvo za klizanje (Mg stearat) količina
Izgled	L	L	L	L	H
Sadržaj	L	L	L	L	L
Uniformnost sadržaja	H	H	L	H	L
Brzina rastvaranja	H	H	H	L	H
Nečistoće	L	H	L	L	L

H – visok nivo rizika, L – nizak nivo rizika

Tabela 1.9. Procena rizika uticaja procesa vlažne granulacije na kritične atribute kvaliteta tableta sa trenutnim oslobađanjem, (Koranicani, 2011)

CQAs	Proces / operacije								
	Suvo mešanje	Granulacija	Aglomeracija	Sušenje	Sitanje	Mešanje	Tabletiranje	Filmovanje	Pakovanje
Sadržaj	L	L	L	L	L	L	L	L	L
Uniformnost sadržaja	L	L	L	L	L	L	L	L	L
Brzina rastvaranja	L	M	L	L	L	L	L	L	L
Nečistoće	L	L	L	M	M	M	M	L	L
MB kvalitet	L	M	M	M	L	L	L	L	L
Non - CQAs									
Izgled	L	H	M	L	M	M	M	L	L
Čvrstina	L	H	M	L	M	M	M	L	L
Frijabilnost	L	M	M	L	M	M	M	L	L

H – visok nivo rizika, M - umeren nivo rizika, L – nizak nivo rizika

Tabela 1.10. Procena rizika uticaja procesa / operacija na kritične atribute kvaliteta tableta sa trenutnim oslobađanjem proizvedenih metodom direktne kompresije, (Yu, 2012)

Product QAs	Proces / operacije				
	Suvo mešanje	Briketiranje	Mlevenje	Lubrikacija	Tabletiranje
Izgled	L	L	L	H	H
Sadržaj	L	L	L	L	H
Uniformnost sadržaja	H	H	H	L	H
Brzina rastvaranja	L	H	H	H	H
Nečistoće	L	L	L	L	L

H – visok nivo rizika, L – nizak nivo rizika

Početa lista potencijalnih parametara koji mogu imati uticaj na attribute kvaliteta pri proizvodnji jednog čvrstog lekovitog oblika, može biti obimna.

U datim primerima, prikazane promenljive su rangirane na osnovu verovatnoće, opasnosti i detektabilnosti, na osnovu prethodnih znanja i inicijalno dobijenih eksperimentalnih podataka, najčešće primenom tehnike procene rizika kao što je, analiza efekata i kritičnosti u slučaju neizvršenja (*Failure mode effects analysis, FMEA*).

Lista će se menjati i smanjivati u toku izvođenja daljih procena i na osnovu sprovedenih eksperimenata (kroz kombinovani eksperimentalni dizajn, mehanističke modele). Pošto se značajni parametri identifikuju, oni mogu biti dodatno proučavani kako bi se dostigao viši nivo razumevanja procesa i razvila odgovarajuća kontrolna strategija.

FDA je izdala dva modela tehničkog dokumenta farmaceutskog razvoja deo modula 3, (*Module 3 Quality 3.2.P.2. Pharmaceutical Development*) za tablete sa trenutnim (FDA, 2012) i modifikovanim (FDA, 2011) oslobađanjem kako bi podržala i olakšala postupak izrade registracionog dosijea uz primenu koncepta dizajna kvaliteta.

#### 1.1.4. ULOGA DIZAJNA EKSPERIMENTA U OKVIRU KONCEPTA DIZAJNA KVALITETA

**Dizajn eksperimenta** (*Design of Experiment, DOE*), EMA kroz ICH Q8(R2) (2009) definiše, kao strukturirani, organizovani metod za određivanje odnosa između faktora koji utiču na proces i izlazne parametre procesa. Dizajniranje eksperimenata je poznato više desetina godina i uveliko se primenjuje u raznim oblastima pa i u okviru farmaceutskog istraživanja, ali je tek kroz koncept dizajna kvaliteta zvanično i potvrđen kao metod izbora.

Shodno konceptu dizajna kvaliteta (Yu, 2008), dizajn eksperimenta se primenjuje praktično tokom celog životnog ciklusa proizvoda: u fazi farmaceutskog razvoja, u toku scale-up kao i u toku post registracionih promena na formulacijama.

U okviru planiranja eksperimenta razlikuju se dve grupe promenljivih / faktora (e-Handbook of statistical methods, April 2012, <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook>):

- **nezavisno promenljive / ulazni faktori** – čije se vrednosti variraju u eksperimentu, kategorišu kao kvalitativni ili kvantitativni faktori i prikazuju realnim ili kodiranim vrednostima. Mogu biti atributi polaznih materijala (npr veličina čestica), atributi formulacije (udeo polimera, procenat vezivnog sredstva) ili parametri procesa (brzina rada, vreme).

- **zavisno promenljive / odgovori sistema** – su parametri koji najkvalitetnije opisuju formulaciju, proces, sistem, finalni farmaceutski oblik, kao što su kritični atributi kvaliteta proizvoda (uniformnost sadržaja, brzina rastvaranja, čvrstina, habavost).

Uticaj nezavisno promenljive na zavisno promenljivu analizira se i iskazuje pomoću matematičkih modela, a služi za identifikovanje: optimalnih uslova; potvrđivanje kritičnih faktora sa najvišim uticajem na kritične attribute kvaliteta gotovog proizvoda; opsega prostora za dizajn.

Dizajn eksperimenta se kao sastavni deo koncepta dizajna kvaliteta, može primenjivati u nekoliko koraka:

*Screening* tehnika u cilju identifikovanja ključnih faktora (Furlanetto, 2006), analiza međufaktorskih efekata, kao metodologija površine odgovara u cilju uspostavljanja veze između kritičnih parametara i kritičnih atributa kvaliteta (Glodek i sar., 2006) i definisanja granica prostora za dizajn (Lunney., 2008).

**Screening tehnika**, se primenjuje u početnoj fazi razvoja nove formulacije (Furlanetto i sar, 2006) ili analitičkog postupka u cilju utvrđivanja značajnosti ispitivanih nezavisno

promenljivih faktora na zavisno promenljive. Nezavisno promenljive mogu biti numeričke i kategoričke, bazirane na primeni matematičkog modela prikazanog opštom jednačinom (1), gde je izračunati regresioni koeficijent mera značajnosti uticaja ispitivanog faktora:

$$Y = b_0 + \sum b_i X_i \quad (1)$$

Y-zavisno promenljiva, tj.odgovor sistema,  $X_i$ -nezavisno promenljiva,  $b_0$ -konstanta,  $b_i$ -regresioni koeficijent,

**Analiza faktorskih efekata** se koristi za opisivanje kritičnih formulacionih promenljivih i međusobnih interakcija (Li i sar., 2003). Sprovodi se nakon definisanja potencijalno značajnih faktora, koji po vrednostima mogu biti i numerički i kategorički. Mogu biti ispitani na više nivoa, a broj promenljivih definiše broj eksperimenata koji se treba izvesti.

**Metodologija površine odgovora** (*Response Surface Methodology, RSM*), se primenjuje za sagledavanje zavisnosti odgovora od nezavisno promenljivih i predviđanja vrednosti odgovora u celoj eksperimentalnoj oblasti pomoću matematičkog modela čije izračunate vrednosti moraju biti dovoljno bliske sa eksperimentalno dobijenim vrednostima. Primenjuje se samo u proceni značaja kvantitativnih faktora. Funkcija se prikazuje u vidu konturnih i trodimenzionalnih dijagrama.

Box Behnke-ov dizajn (Chopra S i sar., 2007), Faktorijski dizajn (Paterakis i sar, 2002; Li i sar., 2003; Petrovic i sar, 2009) i Dizajn smeše (Huang i sar., 2004; Huang i sar., 2005; Petrovic i sar, 2006) su tri različita tipa RSM dizajna koji se vrlo često koriste u razvoju i statističkoj optimizaciji formulacija.

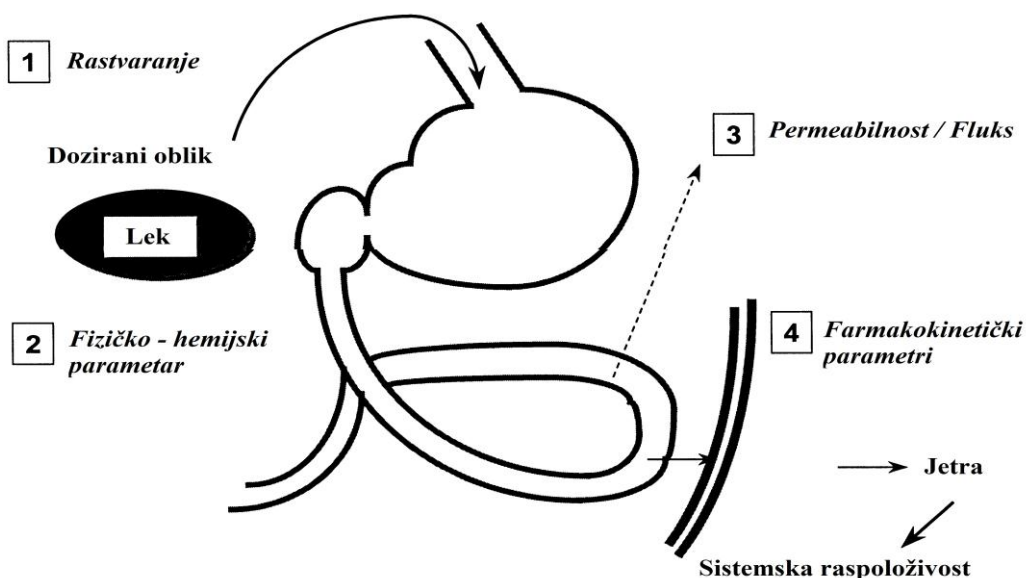
Dizajn smeše se preporučuje, kao koristan model, u slučaju variranja dva ili više faktora, čija je ukupna količina konstantne vrednosti. Zahteva manje eksperimentalnih proba, uz zadržavanje pouzdanosti dobijenih rezultata, pa je stoga vrlo prihvatljiv u fazi razvoja. Statistički model za anлізу rezultata može biti: Linearni model, Dvofaktorski model interakcija (2FI), Trofaktorski model interakcija (3FI), a definiše se na osnovu prethodno postavljenih parametara: standardne devijacije (Sd), koeficijenta korelacije ( $R^2$ ), predvidivog koeficijenta korelacije (adjusted  $R^2$ ), predviđene rezidualne sume kvadrata (PRESS).

### 1.1.5. PRIMENA SISTEMA BIOFARMACEUTSKE KLASIFIKACIJE U OKVIRU KONCEPTA DIZAJNA KVALITETA

Biofarmaceutski sistem klasifikacije (*Biopharmaceutical Classification System, BCS*) definiše suštinske parametre koji opisuju svaku lekovitu supstancu: rastvorljivost i brzinu rastvaranja (Dokoumetzidis i Macheras, 2006, Yasir i sar., 2010) i intestinalnu permeabilnost (Amidon i sar., 1995; Papadopoulou i sar., 2008), a koji služe da ukažu na brzinu i stepen apsorpcije lekovite supstance posle oralne aplikacije (Emami, 2006; Nainar i sar., 2012) *in vivo*.

Na osnovu nađene rastvorljivosti i permeabilnosti, izvršena je klasifikacija lekova u BCS grupe i izdata Lista oralno aplikovanih aktivnih supstanci (Lindenberg, 2004; WHO TRS 937, 2006) od strane svetske zdravstvene organizacije.

Procesi koji se dešavaju u toku oralne apsorpcije leka, prema slici 1.9., mogu se grupisati (Lipka i Amidon, 1999): a) rastvaranje lekovite supstance iz lekovitog oblika, b) rastvaranje lekovite supstance na mestu apsorpcije, koje zavisi od njenih fizičko-hemijskih karakteristika, c) efektivna permeabilnost intestinalne mukoze, d) pre-sistemski metabolizam.



Slika 1.9. Oralna absorpcija lekovite supstance iz farmaceutskog oblika, (Lipka i Amidon, 1999)

Ovi procesi su u direktnoj vezi sa intestinalnim mestom apsorpcije, brzinom pražnjenja želuca i vremenom prolaska kroz gastrointestinalni trakt, GIT, a kod formulacija sa modifikovanim oslobađanjem i sa raspoloživim volumenom intestinalnih fluida, pokretljivosti GIT-a, regionalnim razlikama u intestinalnoj permeabilnosti, metabolizmu i sekreciji, što sve direktno može uticati na brzinu i stepen apsorpcije leka, a time i na bezbednost i efikasnost farmaceutskog oblika.

Dobro poznavanje svih ovih procesa, doprinosi većoj efikasnosti faze razvoja formulacije kao i većoj uspešnosti sagledavanja procene rizika u ranim fazama kliničkih ispitivanja.

Prema konceptu dizajna kvaliteta, biofarmaceutski sistem klasifikacije leka, ima mesto primene u toku farmaceutskog (Yu, 2012) i kliničkog razvoja (Nainar i sar, 2012), odnosno prema BCS grupi aktivne supstance, sagledavaju se potencijalni pravci ispitivanja u odnosu na dizajn formulacije. Faktori odgovorni za dizajn formulacije su: kritični atributi materijala (npr veličina čestica lekovite supstance), kritični parametri procesa (metoda direktne kompresije odnosno vlažne granulacije) i kritični atributi kvaliteta gotovog proizvoda (brzina rastvaranja). Pregled uticaja / povezanosti BCS grupa lekovitih supstanci shodno njihovoj rastvorljivosti i permeabilnosti, sa dizajnom farmaceutskih oblika prikazan je u tabeli 1.11.



Tabela 1.11. Uticaj biofarmaceutskog sistema klasifikacije na dizajn formulacije doziranih oblika, (Yu, 2012)

Grupa I: Visoka Rastvorljivost / Visoka Permeabilnost	Grupa II: Mala Rastvorljivost / Visoka Permeabilnost
<ul style="list-style-type: none"> <li>• bez kritičnih tehnoloških zahteva za brzo delujuće dozirane oblike</li> <li>• kod doziranih oblika sa kontrolisanim oslobađanjem potrebno da se ograniči brzi absorpcioni profil</li> </ul>	<p>Povećanje Rastvorljivosti i ubrzanje profila brzine rastvaranja</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• redukcija veličine čestica</li> <li>• formiranje soli</li> <li>• formiranje čvrstih disperzija</li> <li>• formiranje kompleksa</li> <li>• dodavanje inhibitora precipitacije</li> <li>• stabilizacija metastabilnih formi</li> <li>• primena tehnologije lipida</li> </ul>
Grupa III: Visoka Rastvorljivost / Mala Permeabilnost	Grupa IV: Mala Rastvorljivost / Mala Permeabilnost
<p>Povećanje Permeabilnosti</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• formiranje Prodrug sistema</li> <li>• dodavanje supstanci koje ubrzavaju permeabilnosti (permeation Enhancers)</li> <li>• formulisanje Bioadhezivnih sistema</li> </ul>	<p>Povećanje Rastvorljivosti i Povećanje Permeabilnosti</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• pri formulisanju kombinovati pristupe navedene kod Grupe II i Grupe III BCS, za prevazilaženje problema male permeabilnosti i rastvorljivosti</li> <li>• Aplikacija oralnim putem često nije primenljiva, preći na alternativne načine aplikovanja, kao što je npr. iv. primena</li> </ul>
Grupa V*: Metabolički ili hemijski nestabilne supstance	
<p>Izbeći pojavu nestabilnosti odnosno stabilizovati lekovitu supstancu u farmaceutskom obliku</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• formiranje Prodrug sistema</li> <li>• acidorezistentno oblaganje</li> <li>• upotreba lipidnih nosača (formiranje micela, emulzija / mikroemulzija)</li> <li>• dodavanje Inhibitora enzima</li> <li>• distribucija lifnim sistemom (da se izbegne metabolizam prvog prolaza)</li> <li>• formiranje lipidnih Prodrug sistema</li> </ul>	

\* - Grupa V BCS – sačinjavaju je jedinjenja koja mogu posedovati promenljivu rastvorljivost ili permeabilnost, podležu značajnoj degradaciji u crevima ili poseduju značajnu pre-sistemsku eliminaciju, prema hemijskoj strukturi su grupisani na kisele (Va) i bazne supstance (Vb)

U kliničkom razvoju, biofarmaceutski sistem klasifikacije predstavlja osnovni vodič kod definisanja pravca izvođenja *in vivo* ispitivanja, uspostavljanja *in vitro/in vivo* odnosa i predviđanja rezultata (Nainar i sar., 2012; Jain i sar., 2011), što je prikazano za čvrste oblike sa modifikovanim oslobađanjem leka tabelom 1.12.

Tabela 1.12. Biofarmaceutska klasifikacija i očekivani *in vitro/in vivo* odnos za farmaceutske oblike sa modifikovanim oslobađanjem leka, (Nainar i sar., 2012; Jain i sar., 2011)

Grupa	Rastvorljivost	Permeabilnost	Očekivani <i>in vitro/in vivo</i> odnos
<b>Ia</b>	Visoka & Nezavisna od mesta resorpcije	Visoka & Nezavisna od mesta absorpcije	IVIVK očekivan ukoliko je brzina rastvaranja ograničavajući faktor
<b>Ib</b>	Visoka & Nezavisna od mesta resorpcije	Zavisna od mesta absorpcije & Uzani absorpcioni prozor	IVIVK očekivan
<b>IIa</b>	Mala & Nezavisna od mesta resorpcije	Visoka & Nezavisna od mesta absorpcije	varijabilno
<b>IIb</b>	Mala & Nezavisna od mesta resorpcije	Zavisna od mesta absorpcije & Uski absorpcioni prozor	mala verovatnoća
<b>III</b>	Visoka	Mala	mala verovatnoća
<b>IV</b>	Mala	Mala	mala verovatnoća
<b>Va</b>	Varijabilna	Varijabilna	mala verovatnoća
<b>Vb</b>	Varijabilna	Varijabilna	IVIVK nivoa A očekivan

Kod BCS lekova grupe I i III, brzina rastvaranja nije ograničavajući faktor brzine apsorpcije u *in vivo* uslovima (Yu, 2008), a u slučaju preparata sa modifikovanim oslobađanjem profil oslobađanja kontroliše brzinu apsorpcije (Emami, 2006, Nainar i sar., 2012). Za BCS lekove grupe III, mala permeabilnost na mestu absorpcije ograničava uspešnost apsorpcije i sprovođenja *in vitro/in vivo* ispitivanja.

Za lekove BCS grupe II i IV, brzina rastvaranja je ograničavajući faktor, pa je potrebno sprovesti procenu efikasnosti oralne primene usled male brzine i stepena apsorpcije kroz dodatna ispitivanja brzine rastvaranja i kliničke studije biorasploživosti i bioekvivalencije (Cook i sar., 2008).

U praksi su formulacije sa modifikovanim oslobađanjem (za lekove BCS grupe I), zbog velike brzine rastvaranja same aktivne supstance, kao i susptance visoke permeabilnosti (lekovi BCS grupe II), najbolji kandidati za uspostavljanje *in vitro/in vivo* odnosa, jer je uspešnost apsorpcije uslovljena prvenstveno formulacijom (Cardot i sar., 2012), što se u velikom broju slučajeva može rešiti odgovarajućim tehnološkim rešenjem.

### 1.1.6. IN VITRO/IN VIVO ODNOS I NJEN ZNAČAJ U OKVIRU KONCEPTA DIZAJNA KVALITETA

Prema regulativi, *in vitro/in vivo* odnos je definisan kao predvidiv matematički model koji opisuje vezu između *in vitro* osobina lekovitog oblika i *in vivo* odgovora (CDER, 1997; USP-32, 2012; EMA / CPMP, 2000b). Pod *in vitro* osobinom se podrazumeva brzina ili stepen rastvaranja/oslobađanja leka a *in vivo* odgovor se odnosi na koncentraciju leka u plazmi/količinu apsorbovanog leka. Regulativa predviđa četiri nivoa korelacije (nivo korelacije A, B, C, multipni nivo C), i nekoliko tehnika za uspostavljanje ovih korelacija (Emami, 2006; Qui i sar., 2009). Različiti nivoi korelacije (Cardot i sar., 2007), u cilju uspostavljanje iste, zasnivaju se na poređenju različitih farmakokinetičkih parametara, tabela 1.13.:

Tabela 1.13. Pregled farmakokinetičkih parametara primenjenih kod uspostavljanja različitih nivoa *in vitro/in vivo* korelacija, (Cardot i sar., 2007)

	<i>Nivo A</i>	<i>Nivo B</i>	<i>Nivo C</i>
<i>In vitro</i>	profil brzine rastvaranja	Statistička analiza momenata MDT	vreme rastvaranja 10%, 50%, 90% leka, brzina rastvaranja, disoluciona efikasnost
<i>In vivo</i>	apsorpcioni profil	MRT, MAT	C <sub>mac</sub> , T <sub>max</sub> , K <sub>a</sub> , vreme absorbovanja 10%, 50%, 90% leka, AUC

*MDT, srednje vreme brzine rastvaranja, MRT, srednje vreme zadržavanja, MAT, srednje vreme absorpcije*

Kroz koncept dizajna kvaliteta *in vitro/in vivo* korelacija ima svoje mesto praktično duž celog životnog ciklusa proizvoda, najpre u ranoj fazi razvoja: za karakterizaciju načina oslobađanja, određivanje preliminarnih farmakokinetičkih parametara (bioraspoloživost,  $C_{max}$ , AUC,  $T_{max}$ ) prototip formulacija (sa trenutnim ili modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance) i poređenje sa referentnim; pri odabiru ekscipijenasa i optimizaciji proizvodnog procesa; izboru prihvatljive prototip formulacije za dalji scale-up razvoj. U kasnijoj fazi razvoja kod: ispitivanja bioraspoloživosti i bioekvivalencije (BA/BE) odabrane formulacije na bazi definisanog procesa i ustanovljenih kritičnih atributa kvaliteta gotovog proizvoda; kod provere biorelevantnosti ustanovljenog *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja (Nainar i sar., 2012; D'Souza i sar., 2010; Tong, 2007). U post registracionoj fazi, kao potvrda nepromenjenog kvaliteta proizvoda posle: promene proizvodnog mesta, dobavljača sirovina, manjih promena u procesu proizvodnje ili manjih optimizacija formulacije.

**Nivo korelacije A** – predstavlja najvišu kategoriju korelacije, takozvani "*point-to-point relationship*", jer se uspostavlja veza između celokupnog *in vitro* profila brzine rastvaranja i *in vivo* profila koncentracije lekovite supstance u krvi (Emami, 2006; Qui i sar, 2009).

Za potrebe analize količine absorbovanog leka u krvi, mogu se koristiti model zavisne i model nezavisne tehnike:

**Wagner-Nelson metoda** (Wagner i Nelson, 1963), model zavisna metoda sa primenom u praksi (Souliman i sar, 2006; Cardot, 2007a; Shah i sar., 2009; Mirza i sar., 2013) kod lekovitih supstanci čija se raspodela u organizmu opisuje jednodimenzionalnim farmakokinetičkim modelom, odnosno kod kojih se silazni deo krive vremenske zavisnosti plazma koncentracije može prikazati logaritamsko-linearnom zavisnošću. Prednost metode je veća operativnost jer se resorpcioni profili mogu odrediti bez upotrebe referentnog preparata (Emami, 2006, Mirza i sar., 2013), a konstanta brzine eliminacije se može izračunati iz postresorpcione faze krive zavisnosti plazma koncentracije od vremena za ispitivanu formulaciju.

Količina apsorbovanog leka u vremenu  $t$  se izražava kao frakcija od ukupne apsorbovane količine.

Farmakokinetika teofilina se opisuje jednodimenzionalnim farmakokinetičkim modelom, tako da je ova metoda primenjena u analizi *in vivo* rezultata teofilinskih preparata ispitivanih na psima (Tse i Szeto, 1982; Munday i Fassih, 1995; Gohel i sar, 1997; Ikegami i sar., 2006;), kunićima (El-Yazigi, 1981; El-Yazigi, 1985) i ljudima (Torrent i sar, 1988; Sabnis i Adeyeye, 1998; Tanikawa i sar., 1999; Varshosaz i sar., 2000; Tulain i Rahman, 2008).

**Loo-Riegelmann-ova metoda**, kao model zavisna metoda, primenjuje se kod lekovitih supstanci čija se raspodela u organizmu opisuje višedimenzionalnim farmakokinetičkim modelom, ali pored podataka o peroralnoj primeni preparata zahteva i podatke o intravenskoj primeni leka na istom ispitaniku (Emami, 2006). Nalazi manju primenu u svakodnevnoj praksi.

**Dekonvolucioni model**, model nezavisne numeričke dekonvolucije, bazira se na poređenje rezultata kod peroralne aplikacije i posle intravenske primene bolus injekcija, ili referentnog oralno aplikovanog rastvora kod istog ispitanika, a korelacija ovog tipa je linearna (Emami, 2006, Macha i sar. 2009).

Uspostavljanjem korelacije nivoa A definiše se zavisnost *in vivo* profila koncentracije leka u plazmi i *in vitro* profila brzine rastvaranja, i ovaj model je dalje primenljiv za

potvrdu nepromenjenog kvaliteta proizvoda posle: promene proizvodnog mesta, dobavljača sirovina, manjih promena u procesu proizvodnje i modifikaciji formulacije, uvođenja nove doze aktivne supstance uz korišćenje formulacije istog sastava.

**Nivo korelacije B** – zasniva se na principima statističke analize momenata, gde se porede parametri: *in vitro* srednje vreme rastvaranja (*Mean in vitro dissolution time*, *MDT<sub>vitro</sub>*) sa *in vivo* srednjim vremenom rastvaranja (*Mean in vivo dissolution time*, *MDT<sub>vivo</sub>*) ili srednjim vremenom zadržavanja (*Mean in vivo residence time*, *MRT<sub>vitro</sub>*). Iako se za izračunavanja navedenih parametara, koriste podaci dobijeni u toku celog vremena ispitivanja, ne može se smatrati korelacijom celokupnih *in vitro* i *in vivo* profila oslobađanja, tako da služi u informativne svrhe, kod manjih izmena u formulaciji, promene proizvodnog mesta, ili proizvođača pomoćnih supstanci (CDER, 1997; Emami, 2006; Qui i sar., 2009).

**Nivo korelacije C** – predstavlja poređenje u jednoj tački, parametara *in vitro* brzine rastvaranja (vreme rastvaranja 50% ili 90% doze leka  $T_{50\%}$ ,  $T_{90\%}$ ), i srednje vrednosti farmakokinetičkog parametra ( $C_{max}$ ,  $T_{max}$  ili *AUC*). Pošto se uspostavlja parcijalna veza između apsorpcije i brzine rastvaranja leka, služi u informativne svrhe u ranim fazama razvoja farmaceutskog oblika, za potrebe izbora prototip formulacija, kod promena sastava formulacija (CDER, 1997; Emami, 2006; Qui i sar. 2009).

**Nivo višestruke korelacije C** – zasniva se na poređenju jednog ili više farmakokinetičkih parametra ( $C_{max}$ , *AUC*) sa količinom rastvorene lekovite supstance u više vremenskih intervala (CDER, 1997). Pošto se poređenje sprovodi u najmanje tri tačke (odabrane iz početnog, srednjeg i završnog dela profila brzine rastvaranja), ima veću detaljnost, tako da uspostavljanje višestruke korelacije C nivoa pruža realna očekivanja postizanja i korelacije nivoa A (Emami, 2006).

**Uspostavljanje korelacije** se sprovodi matematičkim prevođenjem koncentracija lekovite supstance nađene u plazmi, u *in vivo* resorbovane frakcije leka i njihovim poređenjem sa *in vitro* rastvorenim frakcijama, primenom regresione analize. Statistički parametri linearne jednačine i koeficijent korelacije veći od 0.97 (Ramana i sar., 2001; Emami, 2006; Macha i sar., 2009; Scheubel i sar., 2010) potvrda su uspostavljene korelacije.

Uspostavljanje i nelinearna zavisnost *in vitro/in vivo* korelacije je moguće u praksi i to prvenstveno kod preparata sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance (Polli i sar., 1996; Dunne i sar., 1997; Hayes i sar., 2004; Parojcic i sar., 2007) i prisutnim mehanizmom anomalnog transporta, a objašnjava se fiziološko – dinamičkim uslovima;

sastav i osobine crevnih fluida, prisustvo hrane, mehanički uslovi i pokretljivost trakta koji se ne mogu u potpunosti simulirati *in vitro* (Dokoumetzidis i Macheras, 2008). Najnoviji trendovi kod analize *in vitro/in vivo* korelacije predlažu uvođenje i analize faktora permeabilnosti u kombinaciji sa profilima brzine rastvaranja *in vitro* (Takano i sar., 2012).

**Predvidivost *in vitro/in vivo* odnosa** predstavlja sposobnost modela da predvidi *in vivo* ponašanje formulacije, na osnovu nađenih vrednosti *in vitro* i može se sprovesti kao interna (povratna kalkulacija raspoloživih rezultata) ili eksterna predvidivost (na osnovu novog seta podataka), Cardot, 2012

Predvidivost modela se zasniva na poređenju eksperimentalno dobijenih i predviđenih farmakokinetičkih parametara ( $C_{max}$ ,  $AUC$ ,  $T_{max}$ ) kroz izračunavanje greške predviđanja. Potvrda predvidivosti modela, potvrđuje biorelevantnost primenjenog *in vitro* testa, odnosno njegovu sposobnost predviđanja *in vivo* rezultata (CDER, 2003; EMA, 2010; Cardot, 2012)

#### 1.1.6.1. *In vivo* ispitivanja

Da bi preparat bio siguran, bezbedan i efikasan po pacijenta, lekovita supstanca iz farmaceutskog oblika u organizmu treba biti oslobođena, resorbovana i distribuirana u potrebnoj dozi i odgovarajućom dinamikom. Kako bi se potvrdio željeni klinički kvalitet, formulacija mora biti ispitana *in vivo* i izvršena njena biofarmaceutska karakterizacija, odnosno definisana njena biološka raspoloživost i izračunati odgovarajući farmakokinetički parametri.

Pri *in vivo* ispitivanju, meri se nivo koncentracije leka u plazmi i određuje: maksimalna koncentracija leka u plazmi  $C_{max}$ , vreme potrebno da se postigne maksimalna koncentracija leka  $T_{max}$ , površina ispod krive plazma koncentracije leka  $AUC$  (Abrahamsson, 2004; Zhu, 2009), apsolutna i relativna bioraspoloživost (Toutain i Bousquet-Melou, 2004).  $C_{max}$  i  $AUC$  su mera stepena resorpcije, a  $T_{max}$  brzine resorpcije (Zhu, 2009).

U okviru koncepta dizajna kvaliteta najnovija razmatranja Polli i sar., 2012, predlažu da se pre izvođenja *in vivo* studije postave željeni farmakokinetički parametri, kao mera kliničkog kvaliteta leka i analizom rizika uspostavi kritičnost istih sa kritičnim atributima kvaliteta gotovog proizvoda, kritičnim parametrima procesa koji predstavljaju meru kvaliteta proizvoda. Kroz *in vivo* ispitivanja obezbedila bi se potvrda

pretpostavljene kritičnosti, kao i objašnjenje nivoa uticaja faktora na dobijanje željenog profila proizvoda.

Biološka raspoloživost opisuje stepen i opseg u kome se lekovita supstanca resorbuje iz farmaceutskog oblika i postaje raspoloživa na mestu delovanja (CDER, 2003; Abrahamsson, 2004). Ispitivanje biološke raspoloživosti se može sprovoditi i u toku razvojne faze novog proizvoda da bi se: podesilo željeno oslobađanje i apsorpcija leka; ispitao uticaja faktora hrane; u cilju uspostavljanja *in vitro/in vivo* odnosa.

Bioekvivalencijom se proverava terapijska ekvivalentnost / jednakost test formulacije i referentnog proizvoda sa tržišta ili ekvivalentnost dva različita puta aplikacije leka, putem poređenja dobijenih vrednosti površina ispod krivih plazma koncentracije leka za dva preparata (Midha i McKay, 2009).

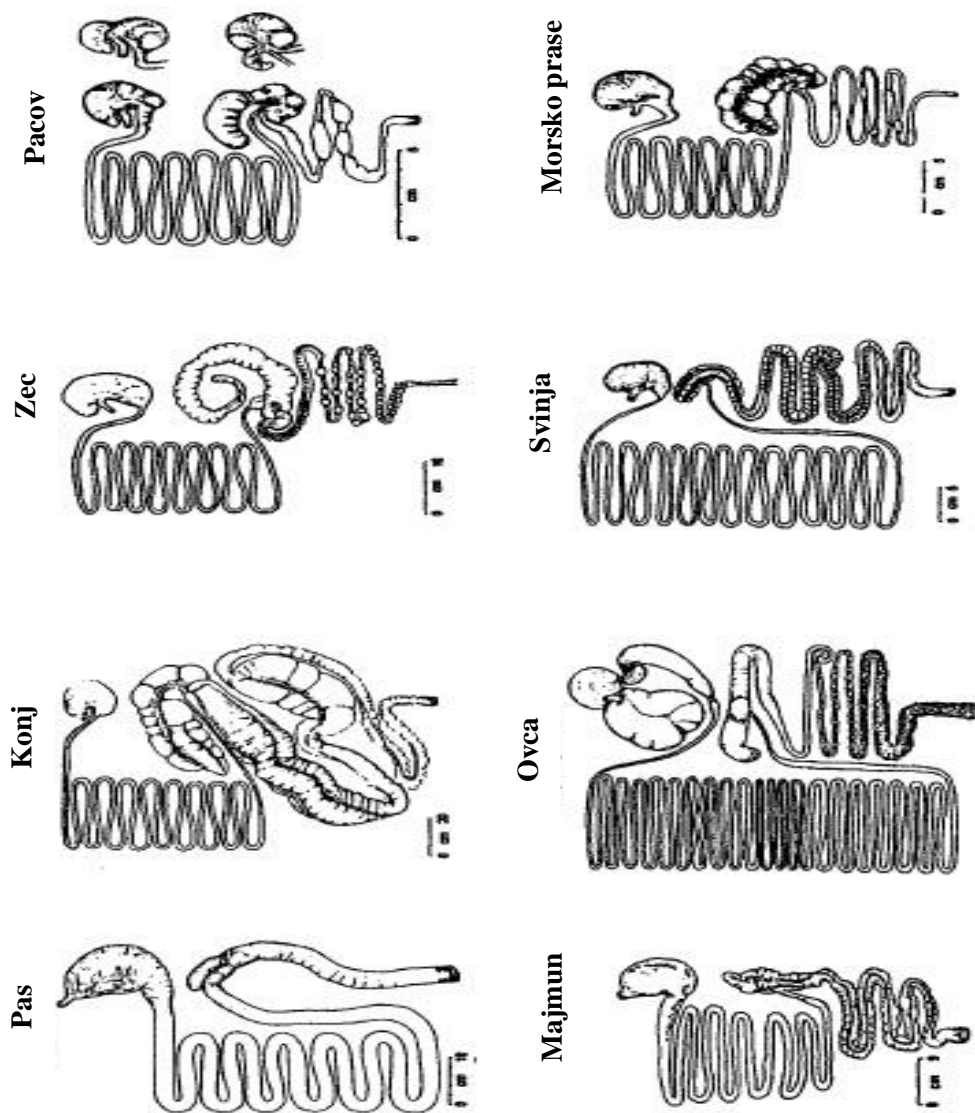
*In vivo* ispitivanja za potrebe biološke raspoloživosti / bioekvivalencije / uspostavljanja *in vitro/in vivo* odnosa sprovode se u skladu sa smernicama važeće evropske (EMA, 2010) i američke regulative (CDER, 2003), na ljudima.

Međutim, preliminarna *in-vivo* ispitivanja za potrebe *in vitro/in vivo* odnosa u ranim fazama razvoja formulacije u svrhu smanjenja troškova i racionalizaciju razvoja, mogu koristiti ispitivanja na životinjama kao modelu.

#### **1.1.6.2. Primena eksperimentalnih životinja, kao modela za *in vivo* ispitivanja**

Ljudi predstavljaju ultimativni model kod *in vivo* ispitivanja biološke raspoloživosti. Ipak, primena životinjskih modela nalazi svoje mesto kod *in vivo* ispitivanja u ranoj fazi prekliničkog razvoja leka, pre nego što su studije na ljudima uopšte izvodljive i opravdane; pri primeni odgovarajućih tehnika uzorkovanja i postavljanja eksperimentalnih uslova, koje nije moguće realizovati na ljudima; u ranoj fazi razvoja formulacije za potrebe odabira prototip formulacija za dalji scale-up; u kasnijim mehanističkim studijama radi razjašnjenja i dopuna rezultata dobijenih na ljudima (Abrahamsson i sar., 2004).

Ograničavajući faktor upotrebe laboratorijskih životinja kao modela je da ni jedna raspoloživa vrsta, u pogledu gastro intestinalne anatomije (slika 1.10., Kararli, 1995) fiziologije i biohemije ne može u potpunosti da simulira uslove gastrointestinalnog trakta kod ljudi (Abrahamsson i sar., 2004; Zhou, 2009).



Slika 1.10. Pregled anatomije gastrointestinalnog trakta eksperimentalnih životinja (Kararli, 1995)

Nameće se rizik, da rezultati dobijeni na životinjskim modelima, neće biti komparabilni za predviđanja na ljudima. Pri ispitivanju čvrstih doziranih oblika glavni uticaj na dobijeni farmakokinetički profil ima fiziologija GI trakta: dužina trakta, vreme zadržavanja leka u različitim segmentima, pokretljivost creva, sekrecija, fizičke i fiziko-hemijske osobine intestinalnih tečnosti, prisustvo enzima koji mogu da metabolišu lek ili upotrebijenu pomoćnu supstancu; prisustvo aktivnih transportera leka unutar GI zida i razlike u metabolizmu prvog prolaza kroz jetru (Kararli, 1995, Ikegami, 2006; Ghimire, 2007). Navedeni problemi mogu biti prevaziđeni izborom najprihvatljivijeg



životinjskog modela i *in vivo* studije odgovarajućeg dizajna, a kroz integraciju rezultata i saznanja o razlikama/sličnostima između ljudi i životinjskog modela, pri interpretaciji dobijenih rezultata (Abrahamsson i sar., 2004; Ikegami, 2006).

U skladu sa konceptom dizajna kvaliteta, da bi *in vivo* studije na životinjama bile uspješne, (Dickinson i sar., 2008; Polli i sar., 2012), pre početka *in vivo* ispitivanja, potrebno je:

a) identifikovati kritične faktore formulacije, kritične parametre procesa i kritične attribute kvaliteta gotovog proizvoda sa potencijalnim uticajem na *in vivo* profil odnosno kritične farmakokinetičke parametre; b) identifikovati fiziološke faktore sa potencijalnim uticajem na *in vivo* profil; c) na osnovu analiza postaviti potencijalni odnos između odabranog životinjskog modela i ljudi.

Kod većine studija na životinjama doza leka aplikovana životinjama usklađena je sa telesnom masom životinje. Pri ispitivanju, posebno čvrstih lekovitih oblika poželjno je aplikovati doze namenjene za primenu kod ljudi, kako bi se izbegla izrada specifične formulacije niske doze samo za potrebe studije na životinjama, što predstavlja dodatan problem kod sistema sa modifikovanim oslobađanje gde oblik i dimenzija tablete mogu uticati na kinetiku i mehanizam oslobađanja lekovite supstance.

Životinjske vrste danas najviše u upotrebi u *in vivo* studijama oralnih doziranih oblika (za doze koje odgovaraju humanoj) su: primati, pas, morsko prase, mačka, kunić, dok se male životinje, pacov i miš koriste za ispitivanja mehanizma apsorpcije i bioraspoloživosti praškova i tečnih farmaceutskih oblika (Zhou, 2009).

Pas, morsko prase i majmun, generalno su anatomske vrste slične ljudima. Sličnost kod psa je u pogledu anatomije, pokretljivosti i vremena zadržavanja leka u GI traktu kao i sastavu sekretornih komponenata i dosta je korišćen kod ispitivanja oralnih preparata uključujući i forme sa modifikovanim oslobađanjem aktivne supstance (Huang, 2004; Löbenberg, 2005; He, 2010; Yin, 2011), preparata na bazi teofilina i aminofilina (Munday i Fassihi, 1995; Yu, 1996; Miyazaki i sar, 2003; Ikegami, 2006; Ghimire, 2007; Hayashi, 2007). Jedna studija navodi 43 različite aktivne supstance testirane na psima, a kao glavnu prednost mogućnost aplikacije doza koje odgovaraju humanoj kao i lakoću rada sa ovom vrstom životinja (Chiou, 2000). Morsko prase se navodi kao povoljan model kod prvog skrininga formulacija sa teofilinom (Davis, 2001), a majmun kao najbliži model ljudima (Ikegami i sar., 2006; Scheubel i sar., 2010) osim problema tehničke prirode (za većim životnim prostorom, visoka cena brige i nege ovih životinja, strogi etički zahtevi).

Literatura s kraja prošlog veka je relativno skromna u pogledu navođenja kunića kao animalnog modela (El-Yazigi, 1981; Tse, 1982; El-Yazigi, 1985; Musko, 2001), da bi poslednjih godina, noviji radovi sadržali mnogo više rezultata o primeni kunića u *in vivo* ispitivanjima preparata sa trenutnim (Ali, 2007; Rasool, 2010), produženim oslobađanjem (Zhu, 2010; Tamilvanan, 2011), mikročestičnih sistema (Eroglu, 2011), preparata na bazi teofilina različite kinetike oslobađanja (Karasulu, 2006; Bhat, 2011; Emeje, 2012;), kao i drugim putevima aplikacije teofilina, inhalacijom (Keir, 2008) ili rektalno (Shiohira, 2009).

### **1.1.6.3. *In vitro* ispitivanja**

Brzina rastvaranja i *in-vitro* ispitivanje brzine rastvaranja predstavljaju važne alatke koncepta dizajna kvaliteta, a njihovo mesto se posebno vidi u ranoj fazi farmaceutskog razvoja, zatim pri uspostavljanju *in vitro/in vivo* odnosa kao i kod ispitivanja stabilnosti formulacija (Tong, 2007; D'Souza i sar., 2010). Na početku životnog ciklusa proizvoda, u toku istraživanja i rane faze razvoja, na raspolaganju su ograničena znanja i iskustva o proizvodu. Prema konceptu dizajna kvaliteta, teži se prikupljanju što više informacija i saznanja u ranoj fazi razvoja, kako bi se olakšao razvoj u kasnijoj fazi i ubrzao postupak komercijalizacije proizvoda. Stoga u ranoj fazi farmaceutskog razvoja, *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja u kombinaciji sa dizajnom eksperimenta, treba da posluži u svrhu identifikacije i razumevanja kritičnih atributa kvaliteta gotovog proizvoda i ulaznih materijala i kritičnih parametara procesa, i definisanja njihovih uticaja na brzinu rastvaranja leka iz formulacija.

*In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja primenjeno za potrebe uspostavljanja *in vitro/in vivo* odnosa takodje je deo koncepta dizajna kvaliteta, u cilju što kompletnijeg razumevanja proizvoda u pogledu aktuelnog mehanizma i brzine oslobađanja iz farmaceutskog oblika. Takodje predstavlja specifičnu vezu ka rezultatima *in vivo* studije i utvrđivanju potencijalnog oslobađanja leka i načina apsorpcije u GI traktu, i razumevanja uticaja funkcionalnih ekcipienta na oslobađanje leka *in vitro* i u organizmu (Selen, 2010). Dobijeni *in vivo* podaci o doziranom obliku, omogućavaju dodatni razvoj i prilagođavanje *in vitro* testa, kako bi se postavili biorelevantni modeli (D'Souza i sar., 2010) koji bolje simuliraju i *in vivo* karakteristike oslobađanja (izbor tipa i volumena medijuma, hidrodinamičkih uslova).

Preparati aminofilina sa produženim / modifikovanim oslobađanjem teofilina u obliku tableta i kapsula raspoloživi su na domaćem i stranim tržištima. Obzirom na značaj koji ovi preparati nalaze u terapiji, sprovedena su *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja raznih komercijalnih preparata od strane više autora (Moller i Langenbacher, 1982; Simons i sar, 1984; Herzfeldt i sar., 1989; Lin i sar., 1990; Smart i sar, 1992), uz primenu različitih aparatura i eksperimentalnih uslova izvođenja testova. Pri tome su konstatovani vrlo različiti profili brzine rastvaranja.

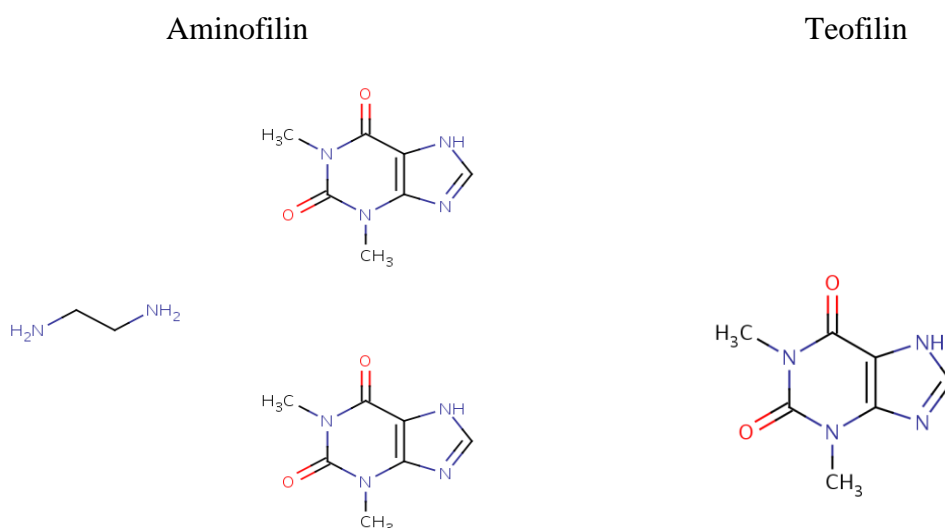
Kod najvećeg broja ispitivanja formulacija aminofilina/teofilina sa modifikovanim oslobađanjem, korišćena je aparatura II USP rotirajuće lopatice, pri brzini mešanja od 50 rpm, 900 ml medijuma istog sastava (voda, pH 1,2 HCl, fosfatni pufer pH 6.8 ili 7.5) u toku celog intervala ispitivanja (Simons i sar., 1982; Hayashi i sar., 2005; Ghimire i sar., 2007; Hayashi i sar., 2007), odnosno kompletna zamena medijuma pH vrednosti 1.2, (HCl ili VŽS), posle 1-2h ispitivanja fosfatnim puferom pH 6.8 (Miyazaki i sar., 2003; Ikegami i sar., 2006; Sakuma i sar., 2009; Emeje i sar., 2012). Metoda poluizmene (Half Change Method) sprovedena kod ispitivanja teofilina u aparaturi I USP rotirajuće korpice pri brzini od 100 rpm (Musko i sar., 2001), takođe se sreće u literaturi.

USP farmakopeja jedina navodi devet *in vitro* testova za ispitivanje preparata sa produženim oslobađanjem teofilina u toku 12 sati, ali samo u obliku kapsula. Oficinalni testovi razlikuju se međusobno po sastavu i pH vrednosti medijuma, tipu aparature, broju obrtaja i zahtevanom profilu oslobađanja. Ni jedna farmakopeja, pa ni USP ne navodi *in vitro* testove ispitivanja brzine oslobađanja aminofilinskih preparata sa modifikovanim oslobađanjem i u obliku tableta.

## 1.2. MODEL SUPSTANCA: AMINOFILIN, TEOFILIN

### 1.2.1. Fizičko - hemijske karakteristike aminofilina i teofilina

Aminofilin (1,3-dimetil-7H-purin-2,6-dion; etan-1,2-diamin,  $C_{16}H_{24}N_{10}O_4$ , molekulske mase 420.4/anhidrovani, 456,5/dihidrat, CAS-317-34-0) je bele do svetlo žute boje praškaste ili granularne strukture (Slika 1.11.), slabo amonijačnog mirisa i gorkog ukusa. Predstavlja kompleks teofilina i etilendiamina (2:1), što u procentima iznosi 84,0 % – 87,4 %, teofilina i 13,5 % - 15,0 % etilendiamina, računato na anhidrovanu supstancu. Može se naći kao anhidrovan ili u obliku dihidrata. Pri stajanju na vazduhu postupno gubi etilendiamin uz oslobađanje teofilina. Lako je rastvoran u vodi, a praktično nerastvoran u alkoholu i etru. Rastvori aminofilina su alkalni, a pri vrednostima pH ispod 8 dolazi do kristalizacije teofilina (Martindale, 2011; USP 32; AHFS, 2011).



Slika 1.11. Strukturna formula Aminofilina i Teofilina

Teofilin je zapravo nosilac farmakološkog dejstva u organizmu, gde se on oslobađa iz kompleksa sa etilendiaminom (aminofilina). Kao derivat dimetilksantina, (1,3-dimetil-7H-purin-2,6-dion,  $C_7H_8N_{10}O_2$ , molekulske mase 180.2, CAS-58-55-9, pKa vrednosti 8.81), sa tačkom topljenja 270-274 °C, beli je kristalni prašak, teže rastvoran u vodi (1:120), etanolu (1:80) i hloroformu (1:10). Rastvara se u rastvorima alkalnih hidroksida, amonijaku i mineralnim kiselinama (Martindale, 2011; USP 32; AHFS, 2011).

Zbog manje rastvorljivosti od aminofilina, često se u preparatima nalazi u obliku aminofilina, koji je lako rastvorna supstanca.

Prema BCS klasifikaciji teofilin pripada I grupi (lako rastvornih - lako permeabilnih) lekova, koji se lako absorbuje u GI traktu (Lindenberg i sar., 2004; Ghimire i sar., 2007).

### **1.2.2. Farmakodinamika i farmakokinetika teofilina**

Teofilin se koristi prvenstveno kao bronhodilatator u terapiji astme i hroničnog opstruktivnog bronhitisa, kao i za ublažavanje tegoba kod neonatalne apneje (Martindale, 2011). Metilksantini, a posebno teofilin dovode do relaksaciju glatkih mišića, ali je u medicinskom pogledu najznačajnija bronhodilatacija. Stoga se i primenjuje kao bronhodilatator u simptomatskoj terapiji astme. Takođe sprečava bronhospazme uzrokovane naporom i u dozama održavanja deluje preventivno na simptome hronične astme. Posebno je pogodan za dugotrajnu terapiju bronhospazma jer je pojava tolerancije na teofilin vrlo retka (AHFS, 2011).

Mehanizmi delovanja teofilin, uprkos dugogodišnjoj primeni, nisu u potpunosti razjašnjeni, i zasnivaju se na pretpostavci da teofilin inhibira fosfodiesterazu, povećavajući količinu cikličnog adenozin monofosfata (cAMP), koji kod glatkih mišića disajnih puteva izaziva relaksaciju (Martindale, 2011).

Plazma koncentracija je linearno zavisna od doze, tako da povećanje doze može biti računato po ovoj zavisnosti (Aronson i sar., 1992).

Doziranje teofilina/aminofilina treba biti individualno usled pojave interindividualnih razlika. Terapijske koncentracije teofilina u plazmi kreću se u granicama između 5 i 20 mg/L (Hurwitz i sar., 1987), odnosno 27 do 110  $\mu\text{mol/L}$  slobodnog (nevezanog) teofilina u plazmi. Za koncentracije veće od 20mg/L ulazi se u toksično područje.

Poseduje usku terapijsku širinu (Varshosaz i sar., 2011), te je za preparate na bazi teofilina vrlo važno ostvariti uniformno oslobađanje i doziranje u organizmu, bez neželjenih fluktuacija nivoa leka u krvi. Ranija istraživanja su pokazala prisustvo značajnih individualnih razlika u bioraspoloživosti medju pacijentima (Musko i sar., 2001) što je objašnjeno promenljivom kinetikom eliminacije teofilina (El-Yazigi i sar.,

1981), a uslovljeno faktorima kao što su vrsta bolesti, starosno doba, telesna masa, režim ishrane, interakcije sa drugim lekovima, pušenje (Aronson i sar., 1992).

Podložan je interakciji sa drugim lekovima, a efekat može biti dvojak: ubrzanje metabolizma teofilina i sniženje njegove koncentraciju u krvi (karbamazepin, fenobarbiton, rifampicin) ili usporavanje metabolizma i porast nivoa teofilina u plazmi (alopurinol, eritromicin), (Aronson i sar., 1992).

Aminofilin kao kompleks teofilina i etilendiamina lako oslobađa teofilin u organizmu, pri čemu je utvrđeno da oslobođeni etilendiamin nema uticaja na farmakokinetiku teofilina, kao i da su potpuno nezavisni i sasvim različiti putevi ADME-sistema (Cotgreave i Caldwell, 1983; Cotgreave i Caldwell, 1985).

Apsorpcija teofilina iz aminofilinskih preparata zavisi od primenjenog farmaceutskog oblika i načina aplikacije. Teofilin se brzo i potpuno apsorbuje iz GIT-a posle oralne aplikacije brzodelujućih formulacija, odložena i nepotpuna apsorpcija može se javiti pri primeni enterosolventnih tableta, odnosno spora i nekompletna iz supozitorija i posle i.m. aplikacije, kod preparata sa modifikovanim oslobađanjem apsorpcija je generalno potpuna, ali na brzinu i obim utiču farmaceutski oblik, individualni faktori. Koncentracija u serumu postiže maksimalnu vrednost već posle 15 min od primene eliksira, 1h do 2h kod brzo delujućih oblika tableta ili kapsula, odnosno oko 4h – 6h nakon oralne primene tableta sa modifikovanim oslobađanjem (Aronson i sar., 1992). Brzina apsorpcije, ali ne i količina resorbovane lekovite supstance, se smanjuje u prisustvu hrane.

Teofilin se lako distribuira po svim tkivima u organizmu, a volumen distribucije se kreće 0,3 do 0,7 L/kg, u proseku oko 0,5 L/kg, ali pokazuje porast kod prevremeno rođene dece, starih i trudnica.

Oko 40% absorbovanog teofilina vezuje se za proteine plazme, na albumine, procenat je veći kod obolelih od bronhijalne astme, manji kod gojaznih osoba i novorođenčadi (AHFS, 2011; Martindale, 2011).

Metaboliše u jetri uz nastajanje tri jedinjenja: 1,3-dimetil-uricne kiseline, 1-dimetil-uricne kiseline i 3-metilksantina (kao najmanje aktivnog metabolita), a kod prevremeno rođene dece zbog slabo razvijenog enzimskog sistema prelazi u kofein (Aronson i sar., 1992; Martindale, 2011).

Metaboliti i oko 10-15% nepromenjenog teofilina se eliminišu mokraćom, a male količine ne promenjenog putem fecesa. Postoje velike individualne razlike u trajanju poluvremena eliminacije teofilina. Kod odraslih osoba poluvreme traje 6-12h, astmatičnih pacijenata nepušača 1,5 - 9,5h, kod pušača i dece 4 - 5h.

Klirens teofilina je 0,5 – 2 ml/kg/min kod odraslih zdravih osoba, 0,65 ml/kg/min kod astmatičara nepušača, značajno je smanjen kod pacijenata sa oštećenjem jetre i srčanom slabošću (AHFS, 2011), a povećan kod pušača.

Postoje zapažanja da je pri višim koncentracijama teofilina u plazmi, kinetika teofilina dozno zavisna, odvija se ne-linearnom eliminacijom tako da promena u dozi može da uzrokuje neproporcionalni porast koncentracije leka u plazmi (Gundert-Remy, 1983). Međutim dodatna istraživanja su pokazala postojanje interindividualna variranja brzine eliminacije teofilina (Milavetz, 1987), odnosno kod preparata sa produženim oslobađanjem potvrđeno je prisustvo linearne dozno-zavisne kinetike, za serumske koncentracije teofilina u terapijskim opsezima (Brown i sar., 1983).

U praksi su potvrđene farmakokinetičke interakcije teofilina sa drugim lekovima koji mogu da povećaju (cimetidin, alopurinol, propranolol, ciprofloksacin, eritromicin, oralni kontraceptivi) ili smanje (karbamazepin, rifampicin, fenitoin, fenobarbital) njegovu terapijsku efikasnost (Hendeles, 1985; Martindale, 2011).

### **1.2.3. Pregled literaturnih podataka o farmakokinetičkoj analizi i mogućnosti uspostavljanja *in vitro/in vivo* odnosa za preparate aminofilina/teofilina na ljudima**

Razvoju formulacija sa modifikovanim oslobađanjem teofilina pristupilo se sa ciljem da se smanji učestalost doziranja i ostvari uniformno oslobađanje i doziranje u organizmu, bez neželjenih fluktuacija nivoa leka u krvi, obzirom da poseduje i usku terapijsku širinu (Musko i sar., 2001; Varshosaz i sar., 2011).

Kao predstavnik BCS klasifikacije grupe I, teofilin je lako rastvoran i lako permeabilan, tako da je ograničavajući faktor za oslobađanje leka dozirani oblik, te se očekuje uspostavljanje *in vitro/in vivo* odnosa, kako u slučaju preparata sa trenutnim, tako i u slučaju preparata sa modifikovanim oslobađanjem.

Za uspostavljanje *in vitro/in vivo* odnosa glavni faktori uticaja su sastav i farmaceutski oblik, kao i pravilno odabran *in vitro* metod ispitivanja brzine rastvaranja koji treba da pokaže biopredvidivost.

Hidroksipropilmetilcelulozne matriks tablete teofilina sa francuskog tržišta su ispitivane u pogledu *in vitro/in vivo* odnosa, pri čemu je vršena selekcija odgovarajućeg *in vitro* testa (Souliman, 2007) ispitivanja.

Biofarmaceutska karakterizacija i korelacija sa *in vivo* rezultatima na ljudima, za 4 različite brzo delujuće formulacije tableta na bazi teofilina ili aminofilina, pokazala je dobru korelaciju sa *in vitro* ispitivanjima brzine rastvaranja kod obe aparature, lopatice i korpica, (Varshosaz, 2000).

Farmakokinetička ispitivanja preparata teofilina u obliku kapsula sa produženim oslobađanjem na ljudima (Torrent i sar, 1988) potvrdila su produženo oslobađanje.

Sa početka osamdesetih godina prošlog veka, sprovedena ispitivanja na više različitih komercijalnih proizvoda (Euphyllin retard film tablete 350mg AP; Pulmi Dur tablete 300 mg TP; Phyllotemp retard tablete, 225mg AP; Theolar retard film tablete 225mg TP ), pokazala su postojanje značajnih razlika u pogledu nađenih plazma koncentracija teofilina, kao i *in vitro* profila oslobađanja; ukazano je na važnosti definisanja uslova (sastav medijuma i tip aparature) izvođenja *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja (Möller i Langenbucher, 1982; Herzfeldt i sar., 1989) u cilju dobijanja što tačnijih podataka o farmaceutskom obliku.

Biološka raspoloživost na zdravim dobrovoljcima i brzina rastvaranja je ispitana na 100 mg tabletama sa produženim oslobađanjem teofilina u poređenju sa podeljenim tabletama (Simons i sar, 1982). Primena polovina tableta nije se reflektovala na rezultate studije biološke raspoloživosti i dobijene parametre: površinu ispod krive (AUC), poluvreme eliminacije ( $T_{1/2}$ ), konstantu brzine eliminacije ( $Ke$ ), prividni volumen distribucije ( $Vd$ ) i klirens ( $Cl$ )

*In vitro/in vivo* korelacija nivoa A, uspostavljena je za referentni preparat Phyllocontin 250 mg aminofilin tablete sa modifikovanim oslobađanjem lipidnog matriks tipa u odnosu na preparat na bazi hidrofilnog matriksa (Lin i sar., 1990).

Sprovedena studija (Sommers i sar, 1992) biološke raspoloživosti na 6 preparata aminofilina/teofilina (Euphyllin retard 350mg, Nuelin SA 250mg, Micro-Phyllin 250mg, Chronophyllin 375mg, Somophyllin CRT 250mg, Theo-Dur 300mg) pokazala je značajne razlike u profilima apsorpcije između preparata, kao i individualne razlike među pacijentima (sa najvećim odstupanjima kod Euphyllin retard 350mg i Nuelin SA 250mg).



*In vitro/in vivo* korelacija i komparativna biološkaraspoloživost (Tulain i Rahman, 2008) dva komercijalna proizvoda 350mg teofilina različitih farmaceutskih oblika tableta sa produženim oslobađanjem i peletama napunjenih kapsula, je ispitivana i zaključeno je da različiti farmaceutski oblici imaju mali uticaj na biološku raspoloživost iz ispitivanih preparata.

*In vitro/in vivo* ispitivanja 300mg teofilin tableta sa produženim oslobađanjem na bazi etilceluloze, pokazala su dobijanje viših vrednosti biološke raspoloživosti u odnosu na referentne proizvode (Ghorab, 2012).

Kod uspostavljanja *in vitro/in vivo* odnosa za BCS I grupu lekovitih supstanci, gde spada i teofilin (Mirza, 2013) od strane FDA slede najnovije preporuke o primeni Wagner Nelson-ove metode u ove svrhe.

#### **1.2.4. Pregled literaturnih podataka o farmakokinetičkoj analizi i mogućnosti uspostavljanja *in vitro/in vivo* odnosa za preparate aminofilina / teofilina kod životinja**

Psi su do sada predstavljali najčešći i najinteresantniji model za ispitivanje kinetike teofilina, tako da se u literaturi može naći niz studija komparativne farmakokinetike različitih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem teofilina.

Poređenje bioraspoloživosti, teofilinskog preparata u formi kapsula sa produženim oslobađanjem etilcelulozom obloženih peleta kod pasa, majmuna i morskog praseta, dalo je rezultate najveće biološke raspoloživosti kod majmuna, a značajno niže i slične vrednosati na psima i morskom prasetu (Ikegami i sar., 2006).

Pri farmakokinetičkim ispitivanjima na psima i ljudima kod dve nove formulacije tableta sa produženim oslobađanjem teofilina (Hayashi i sar., 2007), nađeno je da farmakokinetičke razlike proističu iz razlika u sastavu i tipu formulacija (bubreći i voskasti tip matriksa).

*In vitro/in vivo* odnos je ispitivan na psima i uspostavljena korelacija nivoa A: između test formulacije u formi kapsula sa mini matriks tabletama teofilina i referentnog Theodor preparata (Munday i Fassihi, 1995); hidofilnih matris tableta teofilina na bazi karboksimetil dekstrana uz odgovarajuću adaptaciju *in vitro* testa brzine rastvaranja (Miyazaki i sar., 2003); kod 2 nove formulacije sa modifikovanim oslobađanjem kapsula koje su sadržale obložene i neobložene pelete teofilina od ukupno četiri ispitanih

(Yu i sar., 1996); odnosno kod kompresijom obloženih tableta sa pulsним oslobađanjem teofilina (Ghimire i sar., 2007).

Kunić je značajno manje korišćen kao životinjski model pa je i broj raspoloživih studija manji.

Na kuniću je sprovedena studija kojom su određivani farmakokinetički parametri za 5 proizvoda sa tržišta u formi tableta ili kapsula aminofilina i teofilina. Utvrđena je razlika u biološkoj raspoloživosti među ispitivanim preparatima, potvrđeno nepostojanje značajnih individualnih razlika među ispitivanim jedinkama i ne postojanje dozno zavisne kinetike eliminacije teofilina pri primeni u terapijskom opsegu (El-Yazigi i Sawchuk, 1981; El-Yazigi i Sawchuk, 1985).

U prethodnom periodu kunić je korišćen za potrebe *in vivo* studija i komparacije sa *in vitro* rezultatima u cilju selekcije novih formulacija sa modifikovanim oslobađanja, kao što je: poređenje efekta oblaganja peleta teofilina za dobijanje produženog oslobađanja *in vivo* (Musko i sar., 2001); obloženih bubrećih matriks sistema sa teofilinom (Emeje, 2012); kapsula sa pulsnom kinetikom oslobađanja (Bhat, 2011), a sve sa ciljem smanjenja učestalosti doziranja i smanjenja pojave interindividualnih razlika odnosno fluktuacije plazma koncentracije, za koju se pretpostavlja da potiče od faktora kao što je motilitet GIT-a.

Ispitivana je mogućnost uspostavljanja *in vitro/in vivo* odnosa za ispitivanja izvedena na kunićima, u slučaju pet komercijalnih proizvoda aminofilina/teofilina (El-Yazigi i Sawchuk, 1985), dok je uspostavljena korelacija novoa A (Karasulu i sar., 2006) za formulaciju granula sa modifikovanim oslobađanjem teofilina (na bazi etilceluloze i stearil alkohola) u odnosu na referentni proizvod sa tržišta.

### **1.3. HIDROFILNI MATRIKS SISTEMI SA MODIFIKOVANIM OSLOBAĐANJEM LEKOVITE SUPSTANCE**

Farmaceutski oblici kojima se može odložiti, usporiti, modifikovati ili kontrolisati brzina, vreme ili mesto oslobađanja lekovite supstance u organizmu su široko prihvaćeni, zbog svojih biofarmaceutskih i farmakokinetičkih prednosti nad konvencionalnim doziranim oblicima, kao i iz ekonomskih razloga (Jantzen i Robinson, 2002; Qui i Zhang, 2009).

Hidrofilni matriks sistemi zbog sposobnosti modifikovanog oslobađanja lekovite supstance danas nalaze posebno veliku primenu zbog niza prednosti: postizanje željenog profila oslobađanja, nisu toksični, niske su cene koštanja i prihvaćeni su od strane regulatornih organa (Streubel i sar., 2000; Li i sar., 2005).

Kod ovih sistema lekovita supstanca je homogeno dispergovana u polimernom matriksu, a količina prisutnog polimera predstavlja kritičan faktor u dinamici oslobađanja. Kao hidrofilni sistemi, u vodenim medijumima se rastvaraju ili bubre, oslobađajući aktivnu supstancu putem dva moguća mehanizma kontrolisanom difuzijom i kontrolisanom erozijom. Difuzija je dominantan mehanizam kod oslobađanja lako rastvornih lekovitih supstanci, a erozija kod teško rastvornih supstanci.

Oslobađanje leka iz hidrofilnog matriks sistema, zavisi od fizičko-hemijskih svojstava ulaznih materijala, odnosa komponenata u formulaciji, parametara procesa, molekularne strukture i umreženost polimernih lanaca, nagrađenog gel sloja (Khan i Zhu, 1999; Narasimhan, 2001; Streubel i sar., 2003; Parojcic i sar., 2004; Hayashi i sar., 2005; Kiortsis i sar., 2005; Furlanetto i sar., 2006;). Polimerni materijali za formiranje matriksa ovog tipa mogu biti derivati celuloze, alginati, ksantan guma, polimetakrilati, polimeri akrilne kiseline (karbomeri).

#### **1.3.1. Hidroksipropilmetilceluloza kao sredstvo za postizanje usporenog oslobađanja**

Najčešće korišćeni polimeri za izradu hidrofilnih matriks sistema, su hidroksipropilmetilceluloze (HPMC) visokog i srednjeg viskoziteta, tip K i tip E: Methocel® Premium K100LV, K4M, K15M, K100M; E4M, E10M, (Dow Chemical Company, 2009). Linearne su strukture bez hemijskog umrežavanja, fizički gusto

isprepletanih lanaca, lako rastvorne u vodi uz izrazitu sposobnost bubrenja, koja je odgovorna za kinetiku oslobađanja lekovite supstance, putem kontrolisane difuzije kroz formirani gel sloj i erozije samog sloja (Siepman i Peppas, 2001; Zuleger i sar 2001, 2002).

Na oslobađanje lekovite supstance iz hidrofilnog HPMC matriksa, mogu uticati: tip, koncentracija, veličina i oblik čestica HPMC polimera, tako što sa povećanjem njihovih vrednosti dolazi do usporavanja oslobađanja; rastvorljivost i veličina čestica lekovite supstance; oblik, geometrija i volumen tablete, tako što utiču na ukupnu slobodnu površinu preko koje se ostvaruje oslobađanje (Ford i sar., 1987; Siepmann i sar., 1999; Karasulu i sar., 2000), pri tome se ukupna slobodna površina smanjuje po sledećem redosledu ravne tbl > poluokrugle > skoro sfernog oblika (Siepman i sar., 1999). Količina sredstva za dopunjavanje i njegova rastvorljivost, utiču na oslobađanje tako da lako rastvorni punioci bržim rastvaranjem formiraju pore u gel sloju stvarajući dodatne kanale za difuziju leka (brže oslobađanje lako rastvornih lekovitih supstanci), odnosno bržu eroziju gel sloja (i brže oslobađanje slabo rastvornih lekova); sila i brzina kompresije, količina vlage u granulatu direktno proporcionalno utiču na čvrstinu/poroznost tableta i promenu brzine rastvaranja, te sa porastom vrednosti ovih parametara, nastaju mekše tablete, slabije formiranog gel sloja sa bržim oslobađanjem leka (Li i sar., 2005; Dow Chemical Company, 2009).

Novija istraživanja, primenom QbD pristupa, odnose se na analizu uticaja atributa materijala (tip i veličina čestica HPMC polimera) na fizičke attribute hidrofilnih matriks tableta i kritične attribute kvaliteta proizvoda (Deng i sar, 2011; Robertson i sar, 2012).

### **1.3.2. Karbomer kao sredstvo za postizanje usporenog oslobađanja**

Karbomeri (zaštićeni naziv Carbopol®) su visoko umreženi polimeri akrilne kiseline velikih molekulskih masa, nerastvorni, ali sa izrazito visokom sposobnošću bubrenja u vodi u višim oblastima pH (Lubrizol, 2011a). Prvenstveno se koriste kod formulacija sa mukoadhezivnim (Prudat-Christiaens I sar., 1996; Khanna i sar.,1997; Das I sar., 2004) ili flotirajućim svojstvima (Streubel i sar., 2003; Li i sar., 2003), ali i kod čvrstih oblika sa modifikovanim oslobađanjem (Perez-Marcos i sar, 1994).

Za izradu hidrofinih matriks tableta na raspolaganju je više tipova karbomera: Carbopol® 971P NF - nisko umreženi polimer nove generacije, visoke efikasnosti u postizanju usporavanja oslobađanja posebno u tabletnim formulacijama, Carbopol®

71G NF - hemijski identičan tipu 971P NF sa unapređenim protočnim svojstvima za potrebe primene pri direktnoj kompresiji ili u okviru spoljašnje faze tableta, Carbopol® 974P NF - visoko umreženi polimer za primenu prvenstveno kod oralnih suspenzija i bioadhezivnih sistema (Lubrizol, 2011c; 2011d), kao i tableta sa modifikovanim oslobađanjem. Carbopol® 934 NF ima zakonska ograničenja primene u novim formulacijama usled upotrebe benzena u postupku organske sinteze ovog materijala, mada se dosta koristio u ranijoj praksi za postizanje modifikovanog oslobađanja.

Na oslobađanje lekovite supstance iz matriksa sa karbomerom utiče: tip polimera, pri čemu 971P NF tip kao manje umreženi pokazuje veću efikasnost bubrenja i bolje odlaganje oslobađanja nege 974P NF visoke umreženosti. Sa povećanjem količine karbomera u matriksu postiže se veće usporavanje oslobađanja koje teži linearnom modelu. Step en hidratacije karbomera je pH zavisna veličina, tako da se puna hidratacija postiže pri  $pH > 6$ , a time i najusporenije oslobađanje; pri niskom pH oko 1.2 su nejonizovani, male sposobnosti bubrenja, tako da medijum penetrira brže i oslobađanje leka je veće. Rastvorljivost i veličina čestica lekovite supstance utiču tako što se manje rastvorni lekovi sporije oslobađaju. Geometrija i oblik tableta menjaju ukupnu slobodnu površinu za penetraciju vode i bubrenje a time i dinamiku oslobađanja leka. Prisustvo rastvornih ekscipijenasa (laktoza) povećava brzinu oslobađanja leka, a nerastvornih punilaca (kalcijum fosfat dihidrat) u matriksu usporava oslobađanje. pH vrednost medijuma zbog anjonske prirode polimera, direktno utiče na status bubrenja i brzinu oslobađanja.

Pri sličnim primenjenim koncentracijama polimera, Carbopol® je znatno efikasniji u usporavanju oslobađanja, u poređenju sa celuloznim polimerima. Zabeleženo je (Lubrizol, 2011b) značajno smanjenje brzine oslobađanja teofilina iz tableta na bazi 15-30% w/w Carbopol® 71G računato na masu tablete, u odnosu na tablete istog procentnog sastava ali sa HPMC polimerom.

### **1.3.3. Kombinovanje polimera za postizanje usporenog oslobađanja**

Međusobno kombinovanje hidroksipropilmetilceluloza različitog tipa ili viskoziteta u cilju podešavanja produženog oslobađanja, sreće se često u literaturi. Međutim nema mnogo primera kombinovanja hidroksipropilmetilceluloze i karbomera, koji se inače razlikuju ne samo po hemijskoj strukturi već i mehanizmu oslobađanja leka. Na raspolaganju su rezultati ispitivanja brzine oslobađanja leka iz matriksa na bazi

kombinacije hidroksipropilmetilceluloze (K4M tipa) i Carbopol® 934NF (Khanna i sar., 1997; Li i sar., 2003) ili Carbopol® 974NF (Perez-Marcos i sar, 1994; Perez-Marcos i sar, 1996; Streubel i sar., 2003). Samo jedna publikacija opisuje oslobađanje leka iz matriks sistema na bazi Carbopol® 71G NF ili Carbopol® 971P NF i hidroksipropilmetilceluloze viših viskoziteta, Methocel® K100M i Methocel® K4M (Draganoiu i sar, 2005). Novija istraživanja (Smith, 2009; Colorcon, 2010), potvrđuju postojanje značajnog sinergističkog efekta usporavanja oslobađanja kombinacije hidroksipropilmetilceluloze i karbomera pri ukupnoj koncentraciji polimera od oko 20% (Smith, 2009; Colorcon, 2010).

#### **1.3.4. Mehanizam oslobađanja lekovite supstance iz tableta na bazi kombinacije polimera (hidroksipropilmetilceluloze i karbomera)**

Hidroksipropilmetilceluloza je linearni, pH nezavisni, neumreženi polimer, velike fizičke zapetljanosti polimernih lanaca uz prisustvo vodoničnih veza, lako rastvoran u vodi i izrazite sposobnosti bubrenja koja je suštinska za kinetiku oslobađanja lekovite supstance.

U kontaktu sa vodom ili biološkim tečnostima, dolazi najpre do penetracije tečnosti kroz površinske slojeve tablete, hidratacije polimera na površini, raspeljavanja polimernih lanaca, raskidanja vodoničnih veza i nastajanja gel sloja (Ju i sar., 1995a; 1995b; Gao i sar, 1996; Kim i Fassih, 1997). Nastali gel sloj uzrokuje usporenu difuziju i oslobađanje leka. Sa povećanjem dužine lanaca, povećava se i viskoznost gela, pa je i kretanje leka/difuzija kroz gel i oslobađanje više usporeno. Usled dalje hidratacije i razmicanja polimernih lanaca na periferiji gel sloja, dolazi do mehaničkog odvajanja polimernih molekula sa površine, odnosno površinske erozije sistema. Suštinski oslobađanje leka zasniva se na fazama bubrenja polimera, difuzije leka kroz gel sloj, rastvaranja leka i erozije gel sloja, a opisuje se preko dva mehanizma oslobađanja leka: kontrolisane difuzije kroz gel sloj i erozije samog gel sloja. Za u vodi rastvorne lekove predominantan je mehanizam difuzije, ali je prisutna i erozija samog gel sloja, dok se slabo rastvorni lekovi prvenstveno oslobađaju mehanizmom erozije (Colombo i sar, 1996).

Kod matriksa sa kontrolisanim oslobađanjem, neophodna je brza hidratacija da bi se formirao zaštitni gelirani sloj, što obezbeđuje da se lek i ekscipijensi ne rastvore velikom brzinom u kontaktu sa medijumom. Ukoliko se molekuli leka nađu na površini

matriksa, daće efekat naglog oslobađanja leka u prvom satu ispitivanja "*burst efekat*" (Li i sar, 2005).

Najnovija ispitivanja, Ghimire i saradnika, 2010, opisuju proces erozije hidroksipropilmetilceluloznih matriks tableta *in vivo* kod ljudi, gde se za niske koncentracije polimera beleži početak erozije već u želucu, u vremenu od 30-90 min, a intenzivan i kompletan je za 180 min. Kod viših primenjenih koncentracija polimera erozija u *in vivo* uslovima je uniformna detektuje se oko 30 min posle aplikacije, a završava u kolonu posle oko 360 min.

Za razliku od hidroksipropilmetilceluloze, karbomeri su anjonski (pH zavisni), hemijski umreženi polimeri, nerastvorni u vodi, ali izrazite sposobnosti bubrenja, koja je od suštinskog značaja za postizanje usporenog oslobađanja leka. Zbog jake umreženosti, karbomeri mogu formirati matrikse i pri mnogo nižim koncentracijama polimera u odnosu na polimere linearne strukture. Usled anjonske strukture, u nižim pH oblastima ispod pH 6.0, su u nejonizovanom obliku i bubrenje praktično nije zastupljeno. Hemijska povezanost lanaca, pri bubrenju uslovljava nastajanje makro viskozne oblasti od nabubrele čestice karbomera i mikroviskozne oblasti odnosno kanala ispunjenih vodom kroz koji se obavlja kretanje lekovite supstance. 971P NF tip Carbopola®, predstavlja najnoviju generaciju karbomera koja je unapređena u pogledu kontrole oslobađanja, u smislu manje povezanosti i umreženosti lanaca, te ne pokazuje značajne razlike u viskozitetu između mikro i makro viskoznih oblasti. Zahvaljujući tome ovaj tip polimera mnogo efikasnije i uniformnije kontroliše oslobađanje leka u poređenju sa 974P NF tipom Carbopola® visoke umreženosti.

Proces relaksacije polimera, odnosno periferna erozija prisutna je i kod ovih materijala, ali za razliku od linearnih polimera gde se erozijom vrši rastvaranje molekula, ovde se sreće u fazi pune hidratacije pod dejstvom formiranog osmotskog pritiska unutar gel strukture, koji dovodi do otkidanja ivičnih delova gela i relaksacije polimera.

Oslobađanje lekovite supstance iz karbomer matriksa je kontrolisano procesom difuzije kroz mikroviskozne oblasti (za u vodi rastvorne lekove), ali i mehanizmom relaksacije polimera kao predominantnim kod oslobađanja slabo rastvornih lekovitih supstanci (Lubrizol, 2011a).

Potvrđen je sinergizam u dinamici oslobađanja i veće usporavanje brzine pri kombinovanju hidroksipropilmetilceluloze sa karbomerom, prema novijim istraživanjima (Dragainou i sar 2005; Smith, 2009). Pretpostavlja se da i vodonična veza doprinosi sinergističkom efektu ova dva polimera. Usporavanje oslobađanja se

objašnjava činjenicom da karbomer, sporije bubri uz ispoljavanje pH zavisnog efekta bubrenja iznad pH=6.0, tako da u ranoj fazi i pri nižim pH vrednostima ima mali uticaj na oslobađanje leka, dok u kasnijoj fazi dominira dajući jači gel sloj; hidroksipropilmetilceluloza poseduje bržu sposobnost bubrenja u ranijoj fazi i tu je njen uticaj na oslobađanje leka primaran, međutim u kasnijoj fazi formirani gel sloj od karbomera je jači i on preuzima dominaciju u pogledu oslobađanja (Smith, 2009).

Profil oslobađanja lekovite supstance iz matriksa, karakterišu brzina i mehanizam oslobađanja leka i važni su parametri za karakterizaciju i opisivanje sistema sa modifikovanim oslobađanjem.

Kod analize brzine oslobađanja mogu se koristiti model-zavisne i model-nezavisne metode (Yuksel I sar, 2000; Costa i Sousa-Lobo, 2001).

**Model-zavisnim metodama** definiše se brzina rastvaranja lekovite supstance, uz primenu različitih matematičkih modela, od kojih su modeli korišćeni u radu, prikazani jednačinama 5-7:

Veličine  $k_0$ ,  $k_2$ ,  $k_p$ , predstavljaju konstante brzine oslobađanja lekovite supstance u toku vremena kinetikom nultog reda, kvadratnog korena i power low modelom, a  $n$  označava difuzioni eksponent, kojim se opisuje mehanizam oslobađanja leka

***Kinetički modeli:***

**Model kinetike nultog reda**  $Mt / M_{\infty} = k_0 t$ , (5)  
 $k_0$  - konstanta brzine nultog reda

**Model kinetike kvadratnog korena, Higuchi-jev model**  $Mt / M_{\infty} = k_2 t^{0.5}$  (6)  
 $k_2$  - konstanta brzine kvadratnog korena

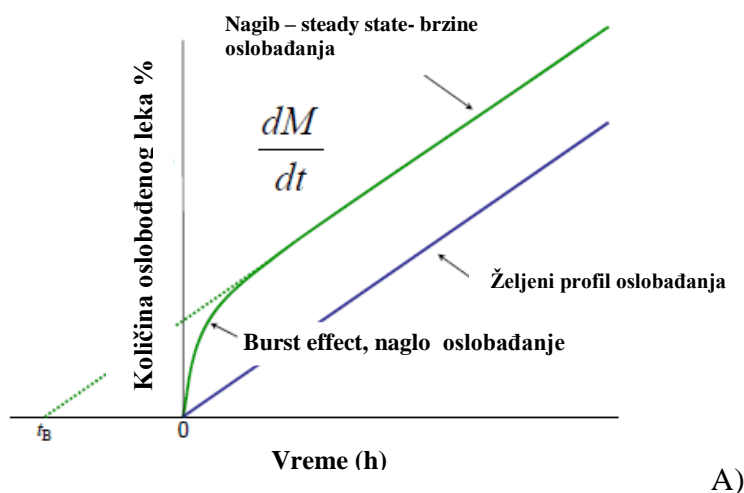
**Peppas-ov, model Power Low model**  $Mt / M_{\infty} = k_p t^n$  (7)  
 $k_p$  - konstanta brzine  $n$  - tog reda

Za kinetiku nultog reda i kod sistema kod kojih je kao mehanizam oslobađanja prisutan proces difuzije, može se sresti pojava naglog oslobađanja leka u početnoj fazi "burst

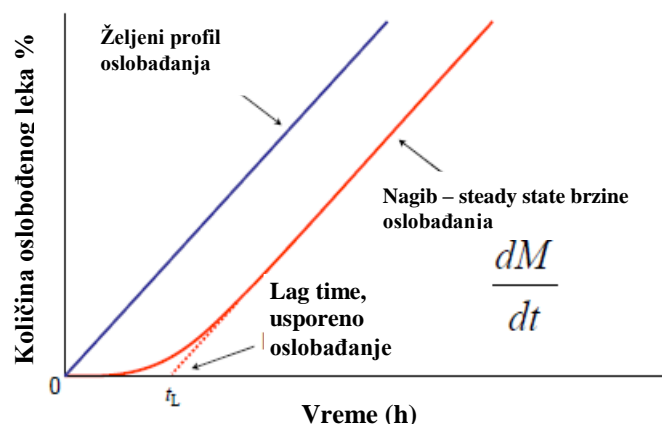


efekat" (*Burst effect*) ili odlaganja oslobađanja leka "*lag time efekat*" (*Lag time effect*) (slika 1.12.).

Ovi fenomeni se prema literaturi objašnjavaju preko procesa difuzije leka kroz polimernu membranu, što se u slučaju bubrećih sistema može aproksimirati na hidratisani gel sloj.



A)



B)

Slika 1.12. Izgled "*burst efekta*" A) i "*lag time efekta*" B)

Prilikom izlaganja sistema sa kontrolisanim oslobađanjem medijumu za rastvaranje, teži se uspostavljanju koncentracionog gradijenta / ravnoteže koncentracije lekovite supstance između sistema i medijuma. Ukoliko je lek prisutan u samoj membrani u početnoj fazi može doći do većeg/naglog oslobađanja leka i ovaj fenomen je označen kao "*burst efekat*". Pošto se uspostavi ravnotežno stanje (*steady state*), uspostavlja se linearno oslobađanje leka i kinetika nultog reda. U suprotnom slučaju, ukoliko

membrana nije zasićena lekovitom supstancom potrebno je vreme da lek iz unutrašnjih delova sistema dospe u medijum što se manifestuje usporenijim oslobađanjem leka, odnosno odlaganjem oslobađanja "*lag time efekat*".

Vrednost "*Lag/Burst*" efekta se određuje kao odsečak na x-osi i izražava u jedinici vremena (slika 1.12).

**Model nezavisnim metodama** se porede profili oslobađanja leka od tačke do tačke i izračunavaju faktor sličnosti  $f_2$  i faktor razlike  $f_1$  (Yuksel i sar, 2000; Costa i Sousa-Lobo, 2001). Dva profila su slična ako je  $f_2 \geq 50$ , odnosno  $f_1 \leq 15$ .

Mehanizam oslobađanja lekovite supstance iz hidrofilnih matriksa može se pretpostaviti na osnovu vrednosti difuzionog eksponenta  $n$  (Korsmeyer i sar, 1983; Yuksel i sar, 2000; Siepmann i Peppas, 2001; Costa i Sousa-Lobo, 2001; Rinaki i sar, 2003), a prema Korsmeyer-Peppas-ovom modelu, prikazanom jednačinom (8):

$$M_t / M_\infty = k_p t^n \quad (8)$$

$M_t / M_\infty$  - frakcija oslobođenog leka,  $k_p$  – konstanta,  $n$  – difuzioni eksponent,  $t$  – ispitivani interval vremena

U zavisnosti od dobijene vrednosti difuzionog eksponenta  $n$ , pri oslobađanju može biti dominantna difuzija, relaksacija (erozija) ili kombinacija oba mehanizma (tabela 1.14.):

Tabela 1.14. Potencijalni mehanizmi oslobađanja leka iz sistema sa geometrijom cilindra ili tankog filma

<b>Difuzioni eksponent</b>	<b>Mehanizam oslobađanja / transporta leka</b>
$n < 0.5$ (0.45)	Kvazi Fick-ova difuzija ili Case I transport
$n = 0.5$ (0.45)	Fick-ova difuzija, difuzioni mehanizam
$0.5 (0.45) < n < 1$ (0.89)	Anomalni transport (non-Fickian difuzija), difuzija i relaksacija (erozija) istovremeno zastupljeni
$n = 1$ (0.89)	Case II transport, (zero order release) kinetika nultog reda
$n > 1$ (0.89)	Super Case II transport (relaxation), relaksacija odnosno erozija

vrednosti  $n$  u zagradi odnose se na sistem sa geometrijom cilindra, a van zagrade na slučaj tankog filma

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Ciljevi istraživanja podeljeni su u tri dela:

**Prvi deo** istraživanja odnosi se na karakterizaciju komercijalnih proizvoda sa tržišta i na postavljanje preliminarnog *in vitro* testa ispitivanja brzine rastvaranja teofilina, koji će biti primenjen za razvoj i odabir prototip formulacija. Ispitivanja će podrazumevati sledeće:

- Usporedna analiza pet komercijalnih proizvoda aminofilin i teofilina sa modifikovanim oslobađanjem u obliku tableta i kapsula i ispitivanje brzina oslobađanja primenom raspoloživih USP *in vitro* testova brzine rastvaranja oficinalnih kod teofilin kapsula sa produženim oslobađanjem. Metoda poluizmene će biti korišćena kao poredbena.
- Analiza uticaja sastava i pH medijuma na brzinu oslobađanja teofilina iz komercijalnog preparata sa trenutnim oslobađanjem. Izabrani medijumi su USP oficinalni, u testovima ispitivanja teofilin kapsula sa produženim oslobađanjem. Cilj je sagledavanje potencijalnog uticaja ovih medijuma na brzinu rastvaranja teofilina, u slučaju primene nekog od navedenih USP testova kod ispitivanja formulacija sa modifikovanim oslobađanjem.
- Primena punog faktorijalnog dizajna sa dve promenljive u cilju procene uticaja brzine obrtaja korpice i oblika tableta na dinamiku oslobađanja teofilina iz tableta na bazi hidrofilnog matriksa. Ispitivanje uticaja tipa aparature (aparatura I i II USP) na oslobađanje iz tableta dva različita oblika.

**Drugi deo** istraživanja odnosi se na razvoj i odabir prototip formulacija i realizovan je kroz nekoliko ciljeva:

- Primena analize rizika radi identifikovanja ciljanog profila kvaliteta proizvoda, potencijalnih kritičnih atributa kvaliteta proizvoda, kritičnih atributa kvaliteta materijala (aktivne supstance), kritičnih formulacionih komponenata i formulacionih promenljivih, kod aminofilin tableta sa modifikovanim oslobađanjem teofilina.
- Primena punog faktorijalnog dizajna sa dve promenljive na dva nivoa, u cilju procene uticaja udela karbomera u matriksu sa hidrokispropilmetilcelulozom, i ukupne količine polimera, na brzinu oslobađanja teofilina iz tableta.

- Primenom eksperimentalnog dizajna smeše biće analiziran uticaj: udela Carbopol® 971P i udela hidrokisipropilmetilceluloze dva različita viskoziteta (Methocel® K100M i Methocel® K4M) u fiksnoj ukupnoj količini matriksa, procenjenih kao značajnih za oslobađanje teofilina iz tableta.
- Analiza dobijenih profila brzine rastvaranja u cilju definisanja brzine i mehanizma oslobađanja teofilina iz tableta, primenom odgovarajućih matematičkih modela.
- U odnosu na dobijene profile oslobađanja kod dva odabrana komercijalna proizvoda, i dobijenih profila kod razvojnih formulacija, primenom optimizacione tehnike eksperimentalnog dizajna smeše, biće izdvojene prototip formulacije za potrebe daljih ispitivanja.

**Treći deo** istraživanja odnosi se na ispitivanje mogućnosti uspostavljanja preliminarnog *in vitro/in vivo* odnosa između odabranih prototip formulacija i komercijalnih proizvoda, a realizovan je kroz sledeće ciljeve:

- Analiza koncentracija leka u krvi kunića u funkciji vremena u cilju potvrde da su odabrane prototip formulacije formulisane na adekvatan način da pokazuju modifikovano, produženo oslobađanje leka i u *in vivo* uslovima.
- Primenom komparativnog generalnog jednodimenzionog faktorijalnog dizajna biće analizirani farmakokinetički parametri prototip i komercijalnih tableta i procenjen efekat formulacije na dinamiku apsorpcije teofilina *in vivo*.
- Provera mogućnosti uspostavljanja *in vitro/in vivo* odnosa za analizirane tablete i prividnog mehanizma apsorpcije između prototip formulacija i komercijalnih preparata.
- Provera linearne predvidivosti *in vitro/in vivo* modela i predvidivosti primenjenog *in vitro* testa ispitivanja brzine rastvaranja.
- Analiza eksperimentalno nađenih profila resorpcije kod kunića i literaturno raspoloživih profila na zdravim dobrovoljcima za jedan od komercijalnih preparata u cilju procene mogućnosti primene kunića kao životinjskog modela u ranoj fazi *in vivo* istraživanja.
- Komparativna analiza dobijenih rezultata u cilju izbora prototip formulacije sa najprihvatljivijim ciljanim profilom kvaliteta proizvoda za dalja ispitivanja.

### **3. EKSPERIMENTALNI DEO**

### 3.1. IN VITRO ISPITIVANJA

U ovom delu prikazani su postupci i rezultati sprovedenih *in vitro* ispitivanja komercijalnih proizvoda sa modifikovanim i trenutnim oslobađanjem, sa domaćeg i stranog tržišta i sopstvenih formulacija radi postavljanja preliminarnog *in vitro* testa ispitivanja brzine rastvaranja teofilina, obzirom da isti nije farmakopejski oficinalan (osim monografije za kapsule sa modifikovanim oslobađanjem teofilina, USP 30).

#### 3.1.1. Materijali i metode

##### 3.1.1.1. Materijali

Sledeći materijali su korišćeni u ispitivanjima:

Komercijalni preparati sa domaćeg i stranog tržišta u obliku tableta i kapsula sa modifikovanim oslobađanjem:

- **Aminofilin tablete** sa produženim oslobađanjem 350 mg, Srbolek ad, Srbija, **R-I**, (odgovara 300 mg anhidrovanog teofilina),  
kvalitativni sastav: *hipromeloza, povidon, celuloza mikrokristalna, stearinska kiselina, silicijum-dioksid koloidni bezvodni, magnezijum-stearat*;
- **Phyllocontin®-350**, tablete Purdue Pharma, Kanada, **R-II**, (odgovara 283.5 mg anhidrovanog teofilina),  
kvalitativni sastav: *cetostearil alkohol, hidroksietilceluloza, povidon, talk, magnezijum-stearat, žuti oksid gvožđa*;
- **Phyllotemp® retard 225 mg** tablete, Mundipharma, GmbH, Nemačka, **R-III**, (odgovara 182.2 mg anhidrovanog teofilina),  
kvalitativni sastav: *cetostearil alkohol, hidroksietilceluloza, povidon, talk, magnezijum-stearat, hipromeloza, talk, makrogol 400, žuti oksid gvožđa*;
- **Aminophyllinum retard 350 mg** tablete, Lek, Slovenija, **R-IV**, (odgovara 300 mg anhidrovanog teofilina),  
kvalitativni sastav: *Methocel E4M, mikrokristalna celuloza, silicijum-dioksid, gliceril palmitostearat, magnezijum-stearat*;
- **Durofilin® kapsule** sa produženim oslobađanjem, tvrde, 250 mg Zdravlje ad, Srbija, **R-V**, (odgovara 250 mg anhidrovanog teofilina),  
kvalitativni sastav: *šećerne sfere, etilceluloza, povidon, talk*.

Sastav navedenih proizvoda dat je prema podacima navedenim od strane proizvođača u *Patient Information Leaflet-PIL* (Aminofilin Srbolek ad, Srbija; Phyllocontin Purdue Pharma, Kanada; PIL, Phyllotemp Mundipharma, Nemačka; Aminophyllinum Lek, Slovenia; Durofilin Zdravlje ad, Srbija) i raspoloživom patentu EP 0 284 849 B1.

Komercijalni preparat sa domaćeg tržišta u obliku tableta sa trenutnim oslobađanjem:

- Aminofilin tablete 100 mg, Hemofarm a.d. Srbija,

Pri izradi formulacija sa modifikovanim oslobađanjem korišćeni su sledeći materijali:

- aminofilin monohidrat (BASF, Germany), aktivna supstanca;
- hidroksipropilmetilceluloza, Methocel® K100M Premium EP (Colorcon, UK), kao matriks formirajuće sredstvo;
- polivinil pirolidon, Kolidon® K-30 (BASF, Germany), kao vezivno sredstvo;
- celuloza mikrokristalna, Avicel® PH 101 (FMC Biopolymers, USA), kao nerastvorni punilac;
- talk (Merck, Germany), kao klizans;
- magnezijum-stearat (Galenika ad, Serbia), kao lubrikans.

Za potrebe *in vitro* ispitivanja pripremani su sledeći USP 30 oficinalni medijumi:

- *Veštački želudačni sok bez enzima pH 1.2 (VŽS)*, pripreman je prema propisu USP farmakopeje, puferski rastvori, rastvaranjem 2g natrijum hlorida i 7ml koncentrovane hloridne kiseline i razblaživanjem vodom do 1000ml. Pepsin nije dodavan.
- *0.1M hlorovodonična kiselina (HCl)*, pripremana je rastvaranjem 8.3 ml koncentrovane hlorovodonične kiseline u 1000 ml vode.
- *Veštački crevni sok bez enzima pH 7.5 (VCS)*, je pripreman po propisu USP farmakopeje, test rastvori, rastvaranjem 6.8 g kalijum dihidrogenfosfata i 1.53 g natrijum hidroksida u vodi i razblaživanjem vode do 1000ml. Pankreatin nije dodavan.
- *Fosfatni puffer pH 6.0 USP*, je pripreman po propisu USP farmakopeje, puferski rastvori, rastvaranjem 2 g kalijumhidrogenfosfata i 8 g kalijumdihidrogenfosfata u 1000 ml vode, a pH vrednost je podešavana dodavanjem koncentrovane fosforne kiseline.



- *0.05M pH 6.6 Fosfatni pufer USP*, je pripreman po propisu USP farmakopeje, puferski rastvori, rastvaranjem 2 g kalijum hidrogenfosfata i 8 g kalijum dihidrogenfosfata u 1000 ml vode, a pH vrednost je podešavana dodavanjem koncentrovane fosforne kiseline.

### **3.1.1.2. Metode**

#### **3.1.1.2.1. Dizajn eksperimenta**

U smislu što potpunijeg sagledavanja uticaja svih potrebnih faktora, radi racionalizacije broja eksperimenata i obrade rezultata primenom raspoložive statističke metode ANOVA, u određenim ispitivanjima je primenjena metodologija dizajna eksperimenta, uz pomoć softverskog paketa Design Expert® 7.0 (Stat-Ease Inc, Minneapolis, USA). U zavisnosti od postavljenog cilja ispitivanja i raspoloživog broja nezavisno promenljivih korišćen je faktorijalni dizajn, opisan kod pojedinačnih ispitivanja.

#### **3.1.1.2.2. Izrada matriks tableta**

Tablete su sadržale 380 mg aminofilin hidrata (što odgovara 300 mg anhidrovanog teofilina), 60 mg polimera Methocel® K100M Premium EP, 50 mg pomoćnih materija (40 % Avicel® PH 101, 30 % Kolidon® K-30 i 30 % mešavine talka i magnezijum-stearata) i bile su pripremljene konvencionalnom metodom nevodene granulacije.

Aktivna supstanca, hidroksipropilmetilceluloza i mikrokristalna celuloza su mešane i granulisane 10 % alkoholnim rastvorom Kolidon® K-30, kao sredstvom za kvašenje i granulaciju. Proces granulacije je izveden u klasičnom granulatoru-mešalici (Thyssen Henchel tip FM/A10, Germany), a masa aglomerisana na situ 4 mm i sušena u fluidnoj sušnici (Münster, Germany) na 45 °C. Posle homogenizacije osušenog prositanog granulata (sito 1 mm) sa talkom i magnezijum-stearatom, komprimovanje mase u tablete (490 mg) je sprovedeno na mašini za tabletiranje (Erweka, Tip EKO) uz korišćenje alata za tabletiranje: bikonkavnog oblika prečnika 11 mm ili ovalnog oblika 15 mm x 7mm. Pritisak kompresije iznosio je oko 1.6 MPa, a čvrstina tableta je održavana u opsegu od 150 N do 200 N.

### **3.1.1.2.3. *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja teofilina iz tableta**

*In vitro* ispitivanja brzine rastvaranja teofilina iz tableta su izvođena u aparaturi II USP sa rotirajućom lopaticom ili aparaturi I USP sa rotirajućom korpicom (Erweka dissolution taster type DT-80, Germany), na  $37 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , u 900 ml medijuma. Sastav i izmena medijuma, kao i brzina mešanja je zavisila od primenjenog testa ispitivanja i detaljno je opisana u odgovarajućim poglavljima.

U slučaju preparata sa modifikovanim oslobađanjem sadržaj je ispitivan nakon svakog sata, a kod preparata sa trenutnim oslobađanjem posle 15 min, 30 min, 45 min i 60 min. Koncentracija teofilina određivana je UV - VIS spektrofotometrijskom metodom na 271 nm. Rezultati su izraženi kao procenat deklarisanog sastava u odnosu na anhidrovani teofilin.

### **3.1.1.2.4. Primena model-zavisnih i model-nezavisnih metoda u analizi profila brzine rastvaranja teofilina iz tableta**

Za procenu i poređenje profila brzina rastvaranja teofilina iz analiziranih tableta i kapsula, korišćene su model-zavisne i model-nezavisne metode (Yuksel i sar., 2000).

Dobijeni profili oslobađanja su poređeni na osnovu izračunatog faktora sličnosti ( $f_2$ ) i faktora razlika ( $f_1$ ) i opisani u pogledu brzine i mehanizma oslobađanja lekovite supstance iz tableta primenom modela kinetike nultog reda, Higuchi modela kvadratnog korena i Korsmayer - Peppas-ovog modela. Potencijalni mehanizam transporta leka je predviđan na osnovu izračunatog difuzionog eksponenta  $n$ , odnosno analizirana je zastupljenost procesa difuzije i / ili erozije.

### 3.1.2. Ispitivanje brzine rastvaranja komercijalnih preparata aminofilina i teofilina sa modifikovanim oslobađanjem

#### 3.1.2.1. Metode

##### 3.1.2.1.1. Pregled korišćenih *in vitro* testova ispitivanja

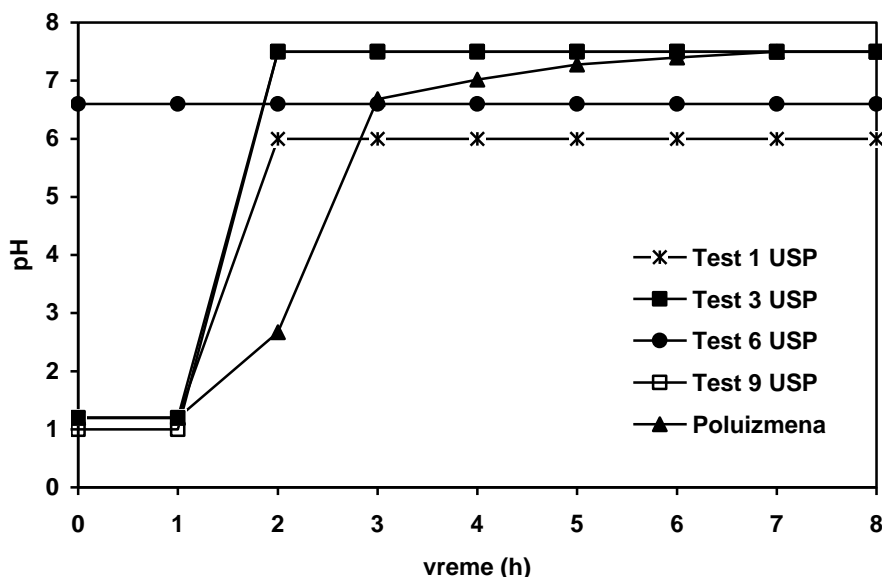
*In vitro* brzine rastvaranja kod pet komercijalnih preparata aminofilina i teofilina, ispitivane su primenom četiri oficinalna testa, u okviru monografije, *Theophylline extended-release capsules* prema USP 30 i metode poluizmene (Ph.Eur. 6.0). Tabelarno su prikazani primenjeni testovi, uslovi izvođenja (tabela 3.1.1.) i farmakopejski postavljene granice oslobađanja teofilina iz kapsula.

Tabela 3.1.1. Pregled primenjenih *in vitro* testova brzine rastvaranja

<i>Test</i>	<i>aparatura</i>	<i>obrtaži</i>	<i>medijum</i>	<i>farmakopejske granice</i>
<i>Test 1, USP</i>	<i>Aparatura II (lopatica)</i>	<b>50 rpm</b>	<i>0-1h: pH 1.2 veštački želudačni sok bez pepsina (VŽS) 2-8h: pH 6.0 fosfatni pufer USP</i>	1h: 3 % - 15 % 2h: 20 % - 40 % 4h: 50 % - 75 % 6h: 65 % - 100 % 8h: ne manje od 80 %
<i>Test 3, USP</i>	<i>Aparatura II (lopatica)</i>	<b>50 rpm</b>	<i>0-1h: pH 1.2 veštački želudačni sok bez pepsina (VŽS) 2-7h: pH 7.5 veštački crevni sok bez enzima (VCS)</i>	1h: 1 % - 17 % 2h: 30 % - 60 % 3h: 50 % - 90 % 4h: ne manje od 65 % 7h: ne manje od 85 %
<i>Test 6, USP</i>	<i>Aparatura I (korpica)</i>	<b>100 rpm</b>	<i>0-8h: 0.05M pH 6.6 fosfatni pufer</i>	1h: 5 % - 15 % 2h: 12 % - 30 % 4h: 25 % - 50 % 5h: 30 % - 60 % 8h: 55 % - 75 %
<i>Test 9, USP</i>	<i>Aparatura I (korpica)</i>	<b>50 rpm</b>	<i>0-1h: 0.1M hlorovodonična kiselina (HCl) 2-6h: pH 7.5 veštački crevni sok bez enzima (VCS)</i>	1h: 5 % - 15 % 2h: 25 % - 45 % 3h: 50 % - 65 % 4h: ne manje od 70 % 6h: ne manje od 85 %
<i>Metoda poluizmene*</i>	<i>Aparatura II (lopatica)</i>	<b>50 rpm</b>	<i>0-1h: pH 1.2 veštački želudačni sok bez pepsina (VŽS) 2-8h: pH 7.5 veštački crevni sok bez enzima (VCS), zamena 450 ml medijuma na svakih sat vremena</i>	1h: 10 % - 30 % 2h: 20 % - 50 % 3h: 30 % - 60 % 4h: 40 % - 70 % 5h: 50 % - 80 % 6h: 60 % - 90 % 7h: 70 % - 100 % 8h: ne manje od 85 %

\* prema Ph Eur 6.0, 2.9.3 *Dissolution test for solid dosage form*

Pored razlika u tipu aparature i brzini obrtaja, korišćeni testovi su se razlikovali i po pH vrednosti medijuma, i na slici 3.1.1. prikazani su teorijski pH profili korišćenih medijuma za ispitivanja.



Slika 3.1.1. Teoretski pH profili korišćenih medijuma

Postupak poluizmene je postavljen u skladu sa smernicama evropske farmakopeje (Ph Eur 6.0, odeljak 2.9.3. *Dissolution test for solid dosage form*), o sukcesivnoj zameni dela medijuma niže pH vrednosti 1.2, sa delom medijum više pH vrednosti koja treba da iznosi oko 7.5.

Primenjeni postupak podrazumevao je da se nakon prvog sata (veštački želudačni sok bez pepsina, pH 1.2) i svakog narednog sata polovina zapremine medijuma (450 ml) zameni medijumom više pH vrednosti (veštački crevni sok bez enzima pH 7.5).

Početna vrednost pH, kod testa poluizmene je bila 1.2, a u toku ispitivanja povećanje pH medijuma se odvijalo na sledeći način: (0-1h) 1.2, (1-2h) 2.67, (2-3h) 6.68, (3-4h) 7.02, (4-5h) 7.28, (5-6h) 7.40, (6-7h) 7.50, (7-8h) 7.50.

Granične vrednosti oslobađanja su postavljene takođe na osnovu zahteva u odeljku 2.9.3., Ph Eur 6.0, specifikacija brzine rastvaranja iz čvrstih oblika sa produženim oslobađanjem o tri ključne tačke ispitivanja u početnoj fazi sa oslobađanjem 20-30 %, tački u kojoj bi se potvrdilo 50 % oslobođenog leka i ne manje od 80 % ispitivanja (na kraju ispitivanog intervala).

### 3.1.2.2. Rezultati i diskusija

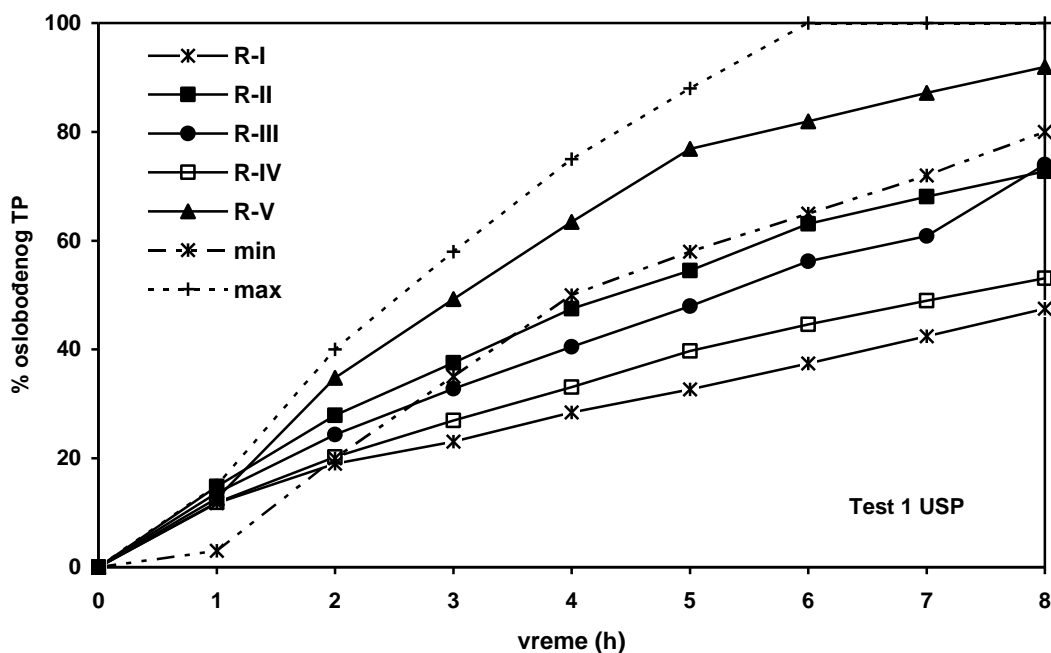
Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja teofilina iz komercijalnih preparata pod različitim eksperimentalnim uslovima prikazani su tabelarno (tabele 3.1.2., 3.1.4., 3.1.6., 3.1.8. i 3.1.10.) i grafički (slike 3.1.2. – 3.1.6.), a izračunati faktor razlike  $f_1$  i faktor sličnosti  $f_2$  u tabelama 3.1.3., 3.1.5., 3.1.7., 3.1.9. i 3.1.11.

Poređenjem rezultata dobijenih ispitivanjem brzine rastvaranja teofilina iz komercijalnih preparata primenom istih *in vitro* testova, može se uočiti da je kod svih testova postignuta različita dinamika oslobađanja koja se može iskazati sledećim odnosom: R-V > R-II ~ R-III > R-IV > R-I. Najkompletnije oslobađanje daje preparat R-V Durofilin® 250 mg Zdravlje, sa 90 % do 99 % oslobođenog teofilina u zavisnosti od testa. Najsporije i praktično nekompletno oslobađanje posle 8 sati ispitivanja u vrednosti od 47 %-56 %, dobijeno je kod proizvoda R-I Aminofilin 350 mg-Srbolek, dok su za 5 %-20 % veće vrednosti nađene kod proizvoda R-IV Aminophyllinum 350 mg-Lek. Preparati R-II Phyllocontin®-350 Purdue Pharma i R-III Phyllotemp® 225mg-Mundipharma, pokazali su sličnu dinamiku oslobađanja, teofilina posle 8 sati ispitivanja, u vrednosti od 72 %-78 % (Test 1 USP , Test 3 USP), odnosno 76 % do 85 % kod Test 6 USP, Test 9 USP i Metode poluizmene. Proizilazi da su kod svih komercijalnih proizvoda (izuzev R-II i R-III) pri primeni istog *in vitro* testa brzine rastvaranja, dobijene različite količine oslobođenog teofilina u funkciji vremena. Literaturni nalazi ukazuju na veliku raznolikost profila kod ispitivanih komercijalnih preparata teofilina prisutnih na tržištu (Simons i sar., 1984; El-Yazigi i sar., 1985; Herzfeldt i sar., 1989) primenom istih *in vitro* testova ispitivanja, a objašnjava se razlikom u sastavu preparata i mehanizmu oslobađanja (Herzfeldt i sar., 1989; Smart i sar., 1992).

Poređenjem farmakopejski datih granica za oslobađanje teofilina iz kapsula kod korišćenih testova, tabela 3.1.1. i slike 3.1.2. – 3.1.6., uočava se da se jedino komercijalni preparat R-V Durofilin® 250 mg-Zdravlje po dinamici oslobađanja uklapa u zahteve Test 1 USP i Test 3 USP. Za preparat R-I Aminofilin 350 mg-Srbolek, kod koga je uočeno nepotpuno oslobađanje u toku 8 h ispitivanja, pokazalo se da se uklapa u zahtev Test 6 USP, koji zapravo ima definisane limite oslobađanja za period od 24h sata. Ostali ispitivani preparati u obliku tableta, ne uklapaju se u granice ni jednog testa.

Tabela 3.1.2. *Test 1 USP*, brzine oslobađanja teofilina iz komercijalnih preparata R-I do R-V

<i>Test 1</i> vreme (h)	<i>R-I</i>		<i>R-II</i>		<i>R-III</i>		<i>R-IV</i>		<i>R-V</i>	
	%	<i>Sd</i>	%	<i>Sd</i>	%	<i>Sd</i>	%	<i>Sd</i>	%	<i>Sd</i>
1	11.75	0.31	14.83	0.57	13.64	0.57	11.87	0.22	12.68	0.41
2	19.00	0.66	27.91	0.93	24.35	0.56	20.22	0.39	34.79	1.30
3	23.06	0.61	37.57	1.35	32.78	1.30	26.95	0.42	49.28	1.79
4	28.41	0.73	47.49	0.83	40.52	1.08	33.06	0.76	63.47	3.14
5	32.68	1.19	54.52	1.21	47.96	0.88	39.75	1.09	76.87	1.20
6	37.45	1.69	63.12	0.45	56.22	1.80	44.60	0.90	81.91	1.66
7	42.44	1.08	68.12	0.96	60.86	1.69	48.98	1.29	87.17	2.07
8	47.49	3.49	72.75	0.37	74.00	2.83	53.10	1.64	91.93	2.08



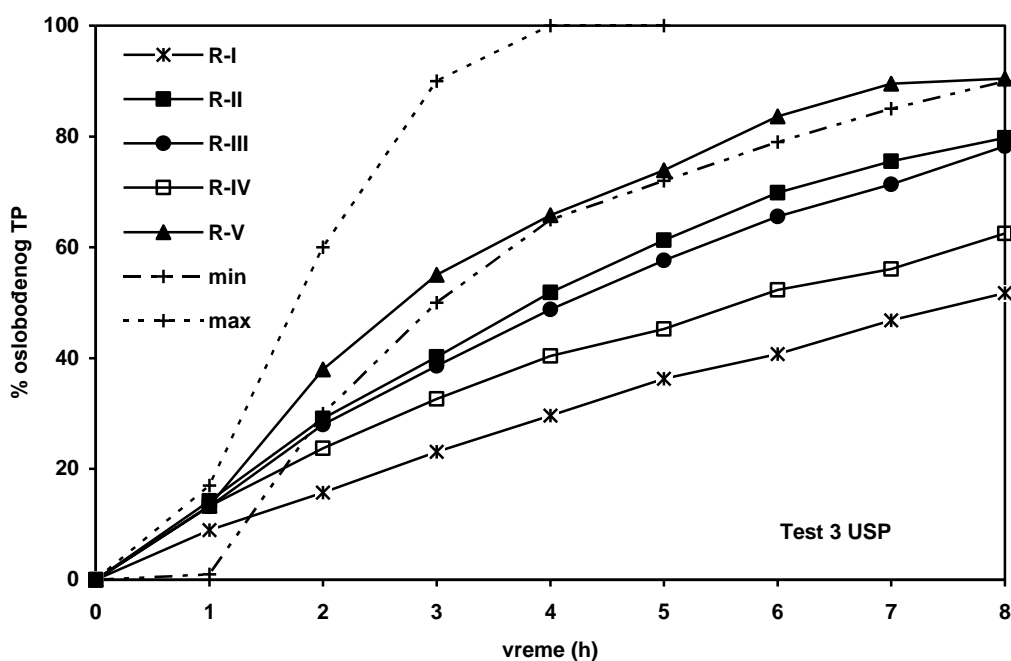
Slika 3.1.2. *Test 1 USP*, profili brzine oslobađanja teofilina iz komercijalnih preparata R-I do R-V

Tabela 3.1.3. *Test 1 USP*, faktor sličnosti i razlike kod analiziranih profila teofilina iz komercijalnih preparata R-I do R-V

<i>Test 1</i>	<i>R-I / R-II</i>	<i>R-I / R-III</i>	<i>R-I / R-IV</i>	<i>R-I / R-V</i>	<i>R-II / R-III</i>	<i>R-II / R-IV</i>	<i>R-II / R-V</i>	<i>R-III / R-IV</i>	<i>R-III / R-V</i>	<i>R-IV / R-V</i>
<b>f1</b>	45,8	36,5	<b>13,9</b>	69,1	<b>10,4</b>	32,4	26,3	22,8	35,3	56,5
<b>f2</b>	35,3	40,6	<b>63,9</b>	22,5	<b>63,2</b>	41,7	39,3	48,7	34,2	25,9

Tabela 3.1.4. *Test 3 USP*, brzine oslobađanja teofilina iz komercijalnih preparata R-I do R-V

<i>Test 3</i> vreme (h)	<i>R-I</i>		<i>R-II</i>		<i>R-III</i>		<i>R-IV</i>		<i>R-V</i>	
	%	<i>Sd</i>	%	<i>Sd</i>	%	<i>Sd</i>	%	<i>Sd</i>	%	<i>Sd</i>
1	8.96	0.41	14.25	0.68	13.23	0.44	13.32	1.51	13.35	2.09
2	15.72	0.33	29.12	0.51	28.00	0.81	23.72	2.16	37.96	3.44
3	23.10	0.72	40.20	1.29	38.60	1.34	32.66	3.10	55.04	3.54
4	29.64	1.23	51.87	1.32	48.76	1.91	40.38	3.74	65.78	2.19
5	36.30	1.39	61.30	2.53	57.65	1.82	45.27	1.06	73.90	2.06
6	40.72	2.00	69.85	1.74	65.54	1.72	52.31	4.62	83.60	1.26
7	46.80	1.89	75.50	2.38	71.34	2.00	56.09	1.26	89.54	4.75
8	51.72	2.82	79.77	1.60	78.23	2.68	62.48	4.76	90.46	2.19



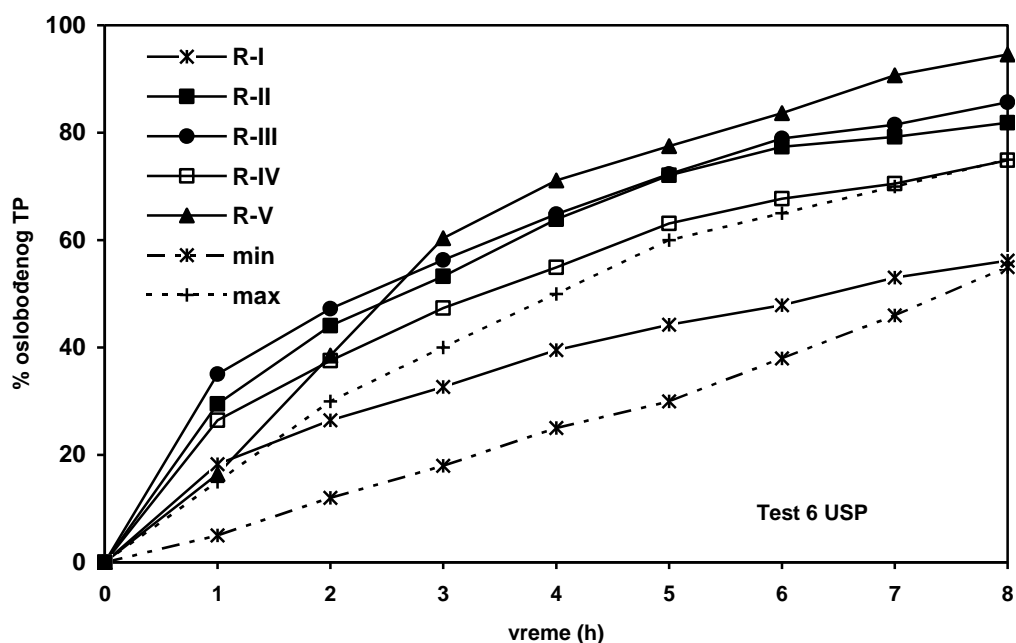
Slika 3.1.3. *Test 3 USP*, profili brzine oslobađanja teofilina iz komercijalnih preparata R-I do R-V

Tabela 3.1.5. *Test 3 USP*, faktor sličnosti i razlike kod analiziranih profila teofilina iz komercijalnih preparata R-I do R-V

<i>Test 3</i>	<i>R-I / R-II</i>	<i>R-I / R-III</i>	<i>R-I / R-IV</i>	<i>R-I / R-V</i>	<i>R-II / R-III</i>	<i>R-II / R-IV</i>	<i>R-II / R-V</i>	<i>R-III / R-IV</i>	<i>R-III / R-V</i>	<i>R-IV / R-V</i>
<b>f1</b>	50,1	45,4	25,3	67,3	<b>5,0</b>	25,6	19,2	20,7	23,8	30,0
<b>f2</b>	32,3	35,1	51,2	23,2	<b>75,8</b>	43,4	50,0	48,2	41,6	43,9

Tabela 3.1.6. *Test 6 USP*, brzine oslobađanja teofilina iz komercijalnih preparata R-I do R-V

<i>Test 6</i> vreme (h)	<i>R-I</i>		<i>R-II</i>		<i>R-III</i>		<i>R-IV</i>		<i>R-V</i>	
	%	<i>Sd</i>	%	<i>Sd</i>	%	<i>Sd</i>	%	<i>Sd</i>	%	<i>Sd</i>
1	18.26	1.01	29.47	0.36	35.02	2.60	26.44	1.01	16.40	1.13
2	26.45	1.54	44.03	0.99	47.25	2.03	37.55	1.15	38.53	2.02
3	32.64	2.00	53.23	1.47	56.28	2.29	47.34	1.35	60.34	2.36
4	39.51	2.96	63.87	0.83	64.84	2.34	54.94	1.71	71.08	3.12
5	44.26	2.73	72.08	1.45	72.28	2.47	63.12	1.38	77.47	3.62
6	47.88	2.82	77.35	1.50	78.91	2.80	67.68	1.95	83.64	3.74
7	53.00	2.72	79.25	1.68	81.52	3.74	70.48	1.90	90.71	4.08
8	56.17	3.31	81.88	1.25	85.66	2.98	74.88	1.74	94.59	4.88



Slika 3.1.4. *Test 6 USP*, profili brzine oslobađanja teofilina iz komercijalnih preparata R-I do R-V

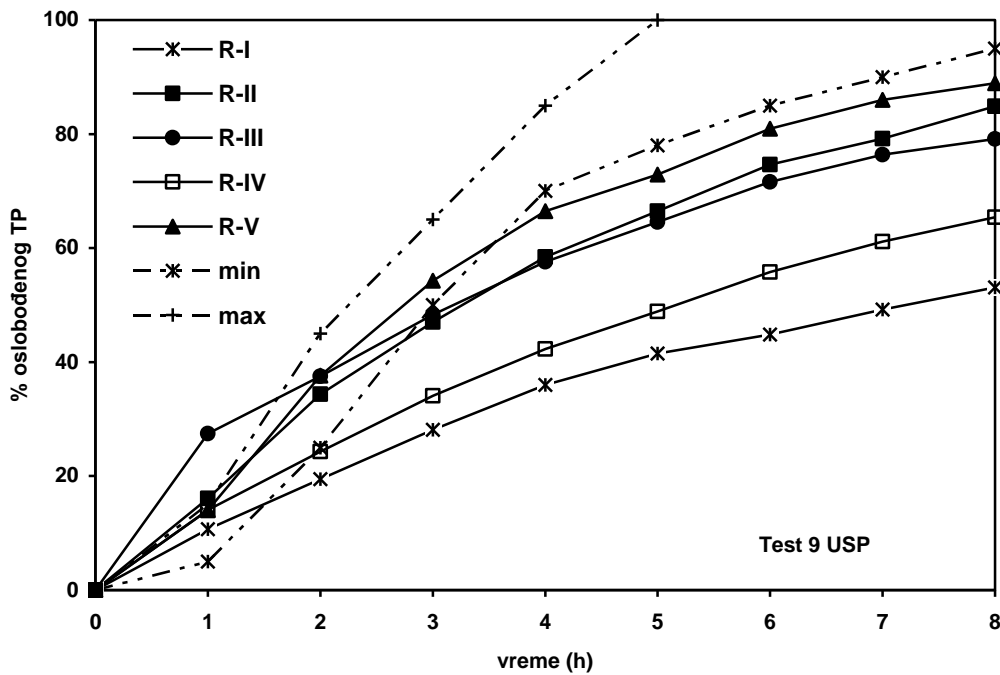
Tabela 3.1.7. *Test 6 USP*, faktor sličnosti i razlike kod analiziranih profila teofilina iz komercijalnih preparata R-I do R-V

<i>Test 6</i>	<i>R-I / R-II</i>	<i>R-I / R-III</i>	<i>R-I / R-IV</i>	<i>R-I / R-V</i>	<i>R-II / R-III</i>	<i>R-II / R-IV</i>	<i>R-II / R-V</i>	<i>R-III / R-IV</i>	<i>R-III / R-V</i>	<i>R-IV / R-V</i>
<b>f1</b>	81,9	48,5	32,7	51,3	<b>4,0</b>	<b>12,4</b>	<b>13,3</b>	<b>12,4</b>	<b>13,3</b>	22,6
<b>f2</b>	31,4	29,4	39,8	26,1	<b>74,8</b>	<b>55,7</b>	<b>51,9</b>	<b>50,0</b>	<b>51,5</b>	41,2



Tabela 3.1.8. *Test 9 USP*, brzine oslobađanja teofilina iz komercijalnih preparata R-I do R-V

<i>Test 9</i> vreme (h)	<i>R-I</i>		<i>R-II</i>		<i>R-III</i>		<i>R-IV</i>		<i>R-V</i>	
	%	<i>Sd</i>	%	<i>Sd</i>	%	<i>Sd</i>	%	<i>Sd</i>	%	<i>Sd</i>
1	10.71	0.34	16.10	0.61	27.43	0.43	14.05	0.53	14.01	0.55
2	19.44	0.39	34.36	1.04	37.53	0.70	24.27	0.73	37.62	0.18
3	28.12	0.84	47.03	0.74	48.31	1.26	34.08	0.87	54.28	0.93
4	35.98	0.99	58.42	0.68	57.61	1.84	42.32	0.86	66.47	0.98
5	41.50	1.09	66.47	0.91	64.58	1.98	48.87	1.14	72.87	1.20
6	44.80	1.03	74.66	1.04	71.58	1.90	55.77	1.24	80.91	1.44
7	49.19	1.79	79.20	1.44	76.35	1.88	61.16	2.03	86.00	2.09
8	53.08	1.43	84.87	1.08	79.16	2.76	65.43	1.27	88.93	1.01



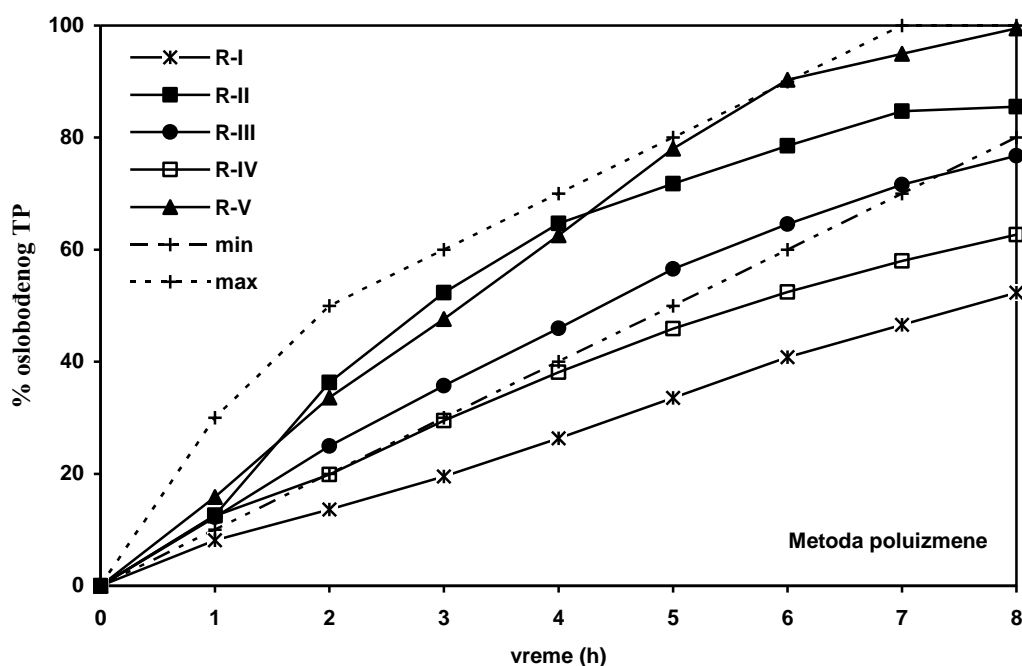
Slika 3.1.5. *Test 9 USP*, profili brzine oslobađanja teofilina iz komercijalnih preparata R-I do R-V

Tabela 3.1.9. *Test 9 USP*, faktor sličnosti i razlike kod analiziranih profila teofilina iz komercijalnih preparata R-I do R-V

<i>Test 9</i>	<i>R-I / R-II</i>	<i>R-I / R-III</i>	<i>R-I / R-IV</i>	<i>R-I / R-V</i>	<i>R-II / R-III</i>	<i>R-II / R-IV</i>	<i>R-II / R-V</i>	<i>R-III / R-IV</i>	<i>R-III / R-V</i>	<i>R-IV / R-V</i>
<b>f1</b>	47,9	48,2	20,1	55,7	<b>6,5</b>	28,5	<b>9,2</b>	28,8	<b>13,6</b>	36,6
<b>f2</b>	31,1	32,1	53,3	26,6	<b>64,9</b>	40,5	<b>61,3</b>	41,7	<b>52,3</b>	33,8

Tabela 3.1.10. *Metoda poluizmene*, brzine oslobađanja teofilina iz komercijalnih preparata R-I do R-V

Metoda poluizmene vreme (h)	R-I		R-II		R-III		R-IV		R-V	
	%	Sd	%	Sd	%	Sd	%	Sd	%	Sd
1	8.10	0.30	12.57	1.19	12.23	0.48	12.47	1.55	15.86	0.55
2	13.64	0.31	36.27	2.30	24.98	0.77	19.88	2.09	33.60	1.63
3	19.53	0.28	52.31	3.58	35.70	1.33	29.46	3.08	47.64	2.64
4	26.31	0.42	64.66	1.30	45.96	1.30	38.14	3.65	62.56	3.68
5	33.53	0.84	71.80	2.20	56.53	1.72	45.90	4.28	78.04	4.16
6	40.83	0.96	78.52	1.29	64.57	1.75	52.43	4.71	90.32	3.40
7	46.62	1.09	84.70	2.21	71.58	1.87	57.98	4.78	94.98	2.85
8	52.30	1.32	85.52	4.74	76.74	3.15	62.66	4.95	99.51	1.64



Slika 3.1.6. *Metoda poluizmene*, profili brzine oslobađanja teofilina iz komercijalnih preparata R-I do R-V

Tabela 3.1.11. *Metoda poluizmene*, faktor sličnosti i razlike kod analiziranih profila teofilina iz komercijalnih preparata R-I do R-V

Metoda poluizmene	R-I / R-II	R-I / R-III	R-I / R-IV	R-I / R-V	R-II / R-III	R-II / R-IV	R-II / R-V	R-III / R-IV	R-III / R-V	R-IV / R-V
f1	67,5	46,9	27,9	73,8	22,4	41,6	<b>10,9</b>	19,8	29,5	48,4
f2	24,3	35,2	49,6	21,0	43,6	32,3	<b>54,4</b>	50,3	36,8	27,5

Sličnosti među profilima oslobađanja određene su primenom model-nezavisne metode izračunavanja faktora razlike  $f_1$  i faktora sličnosti  $f_2$ . Faktor  $f_1$  je razmatran kod poređenja jer u izvesnim slučajevima sličnosti nisu postignute uprkos dobijene vrednosti  $f_2 > 50$ , pošto je  $f_1$  vrednost bila veća od prihvatljivih 15.

Na osnovu vrednosti  $f_2$  i  $f_1$  faktora, sličnost profila oslobađanja je prisutna kod: proizvoda R-II/R-III, Phyllocontin®-350-Purdue Pharma i Phyllotemp® 225 mg-Mundipharma pri ispitivanju skoro svim *in vitro* testovima Test 1 USP ( $f_1=10.4$ ,  $f_2=63.2$ ), Test 3 USP ( $f_1=5.0$ ,  $f_2=75.8$ ), Test 6 USP ( $f_1=4.0$ ,  $f_2=74.8$ ), Test 9 USP ( $f_1=6.5$ ,  $f_2=64.9$ ), izuzev metode poluizmene ( $f_1=22.4$ ,  $f_2=43.6$ ); sličnost profila su pokazali i proizvodi R-I/R-IV, Aminofilin 350 mg-Srbolek i Aminophyllinum 350 mg-Lek, ispitivanjem Testom 1 USP ( $f_1=13.9$ ,  $f_2=63.9$ ); R-II/R-V, Phyllocontin® 350 mg-Purdue Pharma i Durofilin® 250 mg-Zdravlje, Testom 9 USP ( $f_1=9.2$ ,  $f_2=61.3$ ).

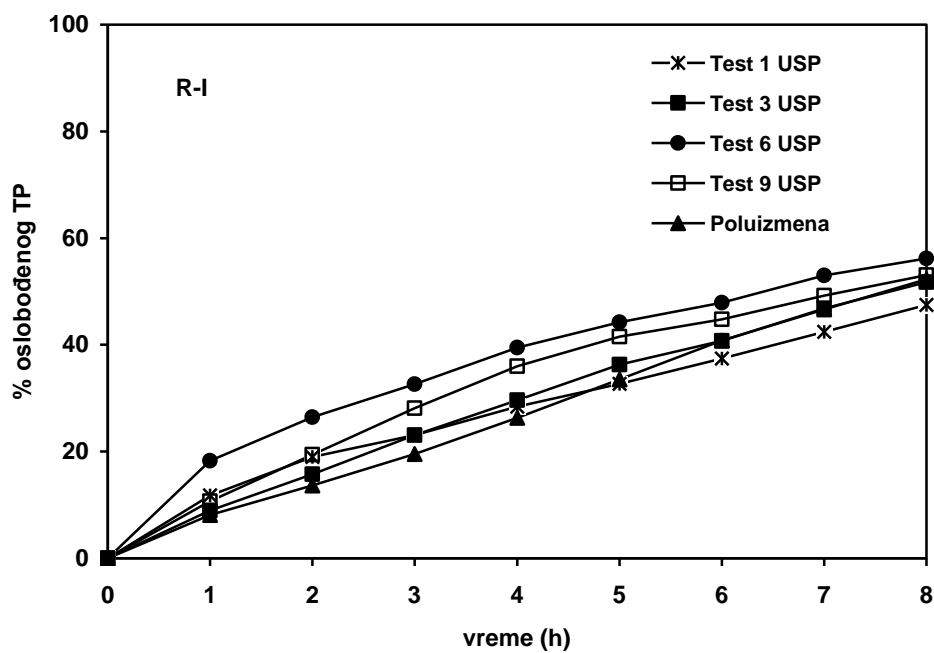
Najviše sličnosti među profilima različitih komercijalnih proizvoda utvrđeno je pri ispitivanju Testom 6 USP tako da su pored pomenute sličnosti R-II/R-III preparata, sličnost profila pokazali i preparat R-II sa proizvodima R-III, R-IV i R-V, a proizvod R-III sa proizvodima R-IV i R-V.

Na slikama 3.1.7.- 3.1.11. prikazani su uporedo rezultati brzine oslobađanja teofilina iz istog komercijalnog preparata, a primenom različitih eksperimentalnih uslova i u tabeli 3.1.12. izračunati faktori  $f_1$  i  $f_2$ .

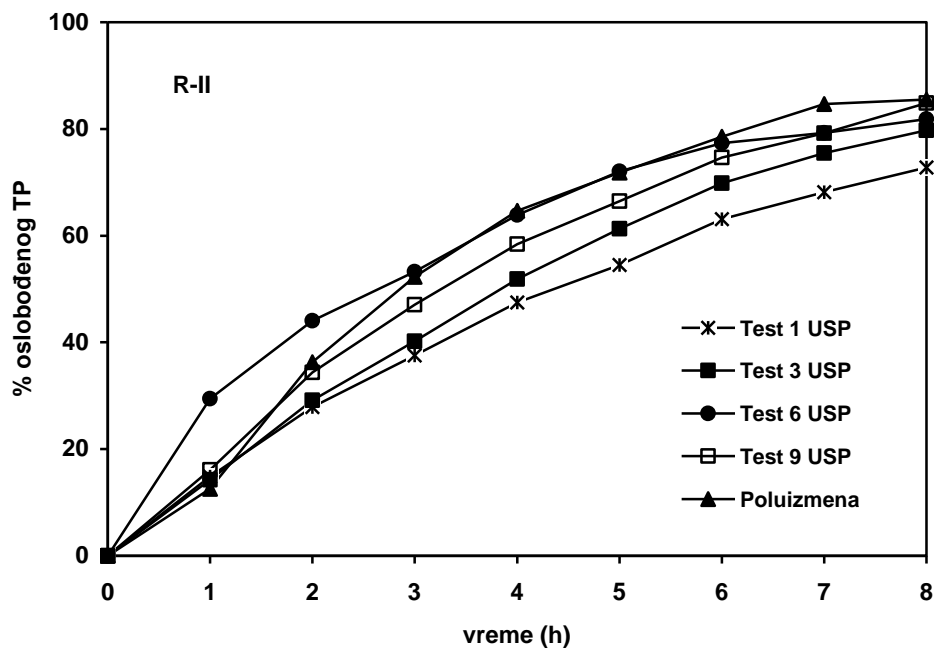
Na osnovu tabele 3.1.1. i slike 3.1.1., Test 3 USP i Test 9 USP razlikuju se međusobno po upotrebljenoj aparaturi, dok su medijum i broj obrtaja isti. Test 3 USP i metoda poluizmene su različiti po dinamici promene pH vrednosti u funkciji vremena, dok je sastav jona u medijumu isti.

Test 1 USP se od Test 3 USP odnosno metode poluizmene razlikuje po pH vrednosti medijuma i sastavu u periodu posle prvog, i do osmog sata ispitivanja. Test 6 USP se od ostalih testova razlikuje po većem broju obrtaja, upotrebi aparature I korpice, pH vrednosti i prisustvu različitih jona u rastvoru.

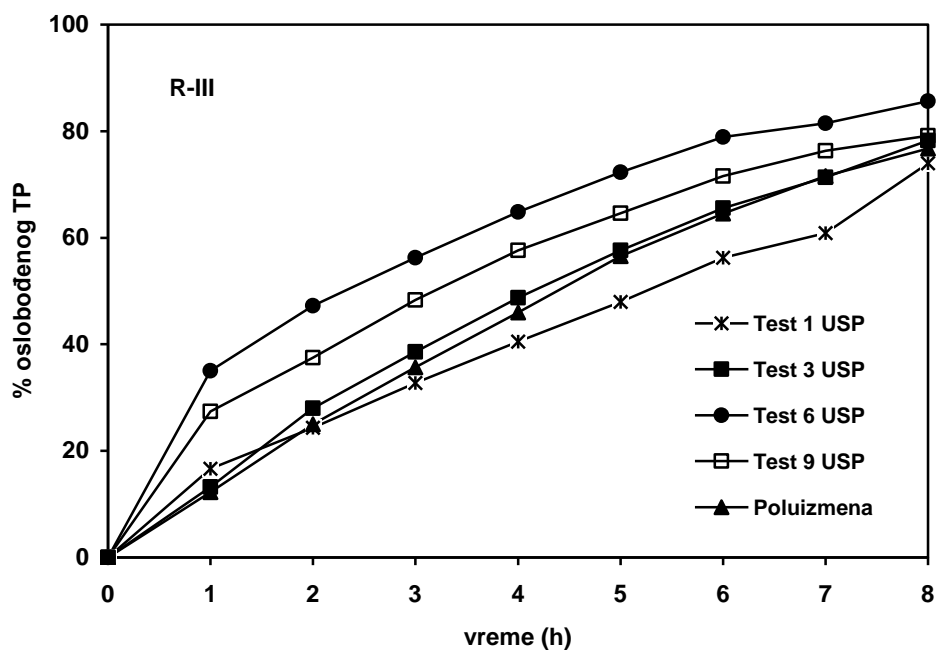
Dobijeni rezultati brzine oslobađanja u pogledu ponašanja komercijalnog preparata u odnosu na sve upotrebljene testove, odnosno uslove ispitivanja razlikovali su se u zavisnosti od preparata.



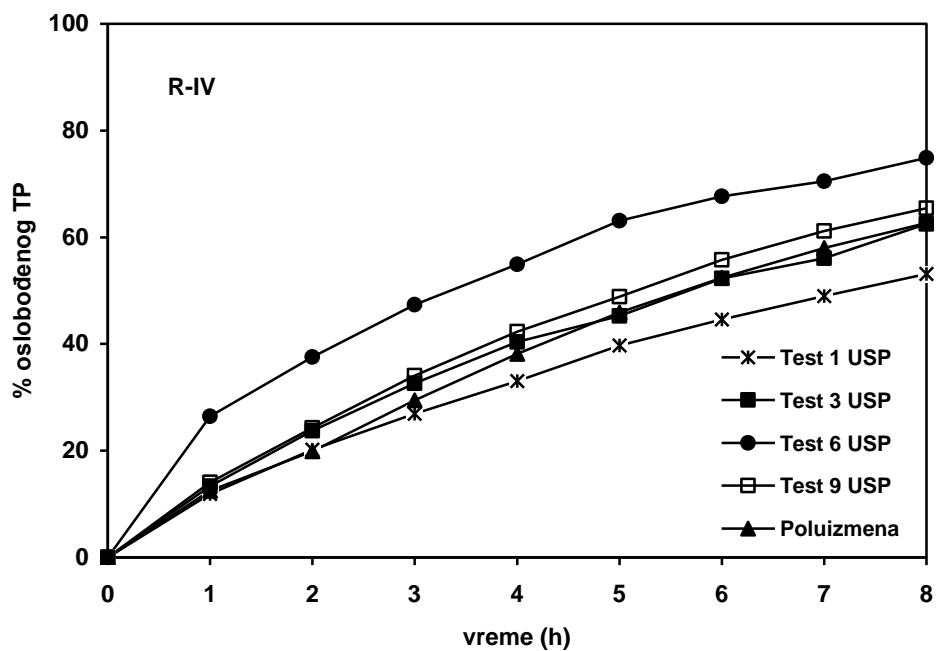
Slika 3.1.7. Profili brzine rastvaranja teofilina iz komercijalnog preparata R-I, pod različitim eksperimentalnim uslovima



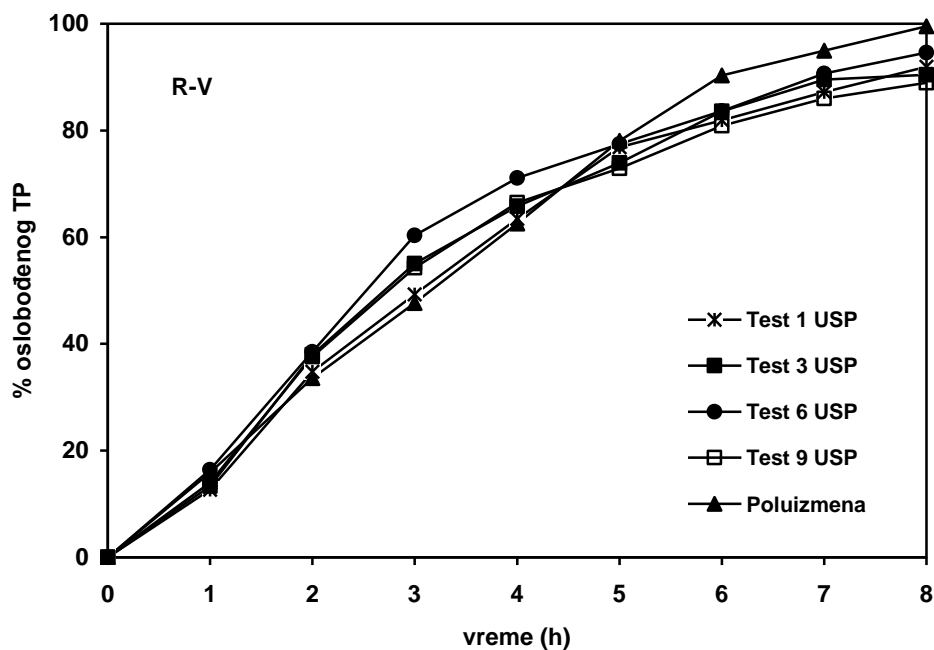
Slika 3.1.8. Profili brzine rastvaranja teofilina iz komercijalnog preparata R-II, pod različitim eksperimentalnim uslovima



Slika 3.1.9. Profili brzine rastvaranja teofilina iz komercijalnog preparata R-III, pod različitim eksperimentalnim uslovima



Slika 3.1.10. Profili brzine rastvaranja teofilina iz komercijalnog preparata R-IV, pod različitim eksperimentalnim uslovima



Slika 3.1.11. Profili brzine rastvaranja teofilina iz komercijalnog preparata R-V, pod različitim eksperimentalnim uslovima

Tabela 3.1.12. Faktor sličnosti i razlike kod analiziranih profila teofilina za Test 1 USP, Test 3 USP, Test 6 USP, Test 9 USP, Metodu poluizmene

Test	R-I		R-II		R-III		R-IV		R-V	
	<i>f1</i>	<i>f2</i>	<i>f1</i>	<i>f2</i>	<i>f1</i>	<i>f2</i>	<i>f1</i>	<i>f2</i>	<i>f1</i>	<i>f2</i>
T1 / T3	9.2	<b>78.9</b>	9.1	<b>63.5</b>	13.8	<b>56.7</b>	15.8	59.4	4.1	<b>75.5</b>
T1 / T6	27.1	50.7	26.9	41.7	39.3	33.1	45.5	34.2	6.7	<b>61.1</b>
T1 / T9	16.2	60.6	17.7	49.9	27.6	41.9	21.6	51.9	4.3	<b>75.1</b>
T-1/ Poluizmena	11.5	<b>70.6</b>	24.0	42.7	11.0	<b>60.2</b>	13.7	<b>60.2</b>	6.2	<b>64.3</b>
T3 / T6	22.8	53.7	17.2	47.9	26.1	40.2	30.2	41.7	4.4	<b>72.1</b>
T3 / T9	11.1	<b>68.8</b>	8.9	<b>64.1</b>	14.2	53.4	5.9	<b>75.9</b>	2.2	<b>84.7</b>
T3- Poluizmena	5.5	<b>81.3</b>	14.9	<b>51.8</b>	3.4	<b>82.8</b>	4.0	<b>81.8</b>	8.3	<b>61.7</b>
T6 / T9	11.8	<b>65.7</b>	9.6	<b>57.6</b>	29.3	37.9	24.5	45.7	6.1	<b>67.8</b>
T6 / Poluizmena	27.7	49.5	7.5	<b>57.5</b>	17.5	49.6	32.4	40.3	8.2	<b>58.9</b>
T9 / Poluizmena	16.0	60.6	6.8	<b>67.2</b>	12.0	<b>56.1</b>	8.1	<b>71.9</b>	9.9	<b>57.7</b>

Za sve primenjene testove ispitivanja, dobijeni profili su vrlo slični (slika 3.1.11.) kod preparata R-V, Durofilin® 250 mg-Zdravlje što potvrđuju i izračunati faktori sličnosti i razlike (tabela 3.1.12.), sa vrednostima  $f_1=2.2 - 9.9$ , odnosno  $f_2=87.7$  do  $84.7$ , što navodi na pretpostavku da je raspoloživi farmaceutski oblik vrlo robustan u pogledu variranja uslova izvođenja *in vitro* testova.

Za Test 3 USP i Test 9 USP, dobijeni profili oslobađanja svih pet preparata, pokazali su generalno isti trend, uz neznatno veće količine oslobođenog leka za Test 9 USP. Izračunate vrednosti faktora  $f_2=53.4-84,7$  i  $f_1=2.2-14.2$ , potvrđuju međusobnu sličnost profila što ukazuje da tip aparature ne utiče na brzinu rastvaranja teofilina iz preparata R-I do R-V (kod Test 3 USP i Test 9 USP).

Kod Test 3 USP i metode poluizmene, faktori sličnosti  $f_2=51.8-82.8$  i razlike  $f_1=3.4-14.9$ , potvrđuju sličnost profila kod svih preparata, te sledi da postupak sukcesivne zamene delom medijuma više pH vrednosti nema uticaja na profil oslobađanja teofilina iz komercijalnih proizvoda. Primena metode poluizmene bazira se na principu da sukcesivna zamena medijuma u toku vremena *in vitro*, može postići bolju simulaciju *in vivo* uslova, što se kao prednost ove metode navodi kod ispitivanja tableta teofilina sa modifikovanim oslobađanjem (Kissne, 1990), odnosno kao zahtev monografije britanske farmakopeje izdanje 2007, kod ispitivanja produženog oslobađanja izonijazida iz bubrečeg matriksa (Akhtar i sar, 2011) i dvoslojnih tableta flurbiprofena (Sharif i sar, 2011). Pri tome samo izvođenje testa zahteva vreme kod rutinskih analiza serija iz redovne proizvodnje, u pogledu pripreme medijuma i postupka njegove zamene u definisanim vremenskim intervalima. Stoga sličnost rezultata ispitivanja sa Test 3 USP pruža mogućnost da se ovom testu da prednost u odnosu na poluizmenu zbog veće jednostavnosti izvođenja.

Razlika pH medijuma u intervalu od drugog do osmog sata ispitivanja pH=6.0 (Test 1 USP) i pH=7.5 (Test 3 USP), pokazalo se da nema uticaja na nađene profile oslobađanja, odnosno nađena je sličnost profila oslobađanja izuzev komercijalnog preparata R-IV Aminophyllinum 350 mg-Lek ( $f_2=59.4$ ,  $f_1=15.8$ ).

Viša vrednost medijuma, pH=6.6 (Test 6 USP), u prvom satu ispitivanja i veća brzina okretanja korpice, 100rpm, (u odnosu na Test 9 USP) ima uticaj i uočavaju se razlike u profilima oslobađanja preparata R-III i R-IV. Pri poređenju sa Test 1 USP, Test 3 USP i metodom poluizmene, gde se dodatno menja i tip aparature, sličnost profila zadržava samo preparat R-V Durofilin® 250 mg-Zdravlje.

Uočeni odnosi ukazuju, da na oslobađanje teofilina iz analiziranih preparata, primarni uticaj ima sama formulacija odnosno razlike u tehnološkim rešenjima, primenjenim pomoćnim supstancama i proizvodnim postupcima za postizanje modifikovanog oslobađanja teofilina, što je u skladu sa literaturnim nalazima pri *in vitro* ispitivanju različitih preparata teofilina sa modifikovanim oslobađanjem na tržištu (Möller H, Langenbucher, 1982; Herzfeldt i sar., 1989; Sommers i sar., 1992), za razliku od preparata sa trenutnim oslobađanjem gde je zbog manje kompleksnosti formulacije konstatovana bioekvivalentnost među ispitivanim preparatim (Varshosaz i sar., 2000).

Obzirom da je teofilin predstavnik grupe I biofarmaceutskog sistema klasifikacije, lako rastvoran i lako permeabilan, dozirani oblik ima primarni uticaj na dinamiku oslobađanja posebno kod formulacija sa modifikovanim oslobađanjem (Emami, 2006, Nainar i sar., 2012; Cardot i Davit, 2012), što je u saglasnosti sa uočenim ponašanjem ispitivanih preparata. Kvalitativni sastavi komercijalnih preparata, pokazuju da je modifikovano oslobađanje postignuto primenom različitih tipova pomoćnih supstanci, te je i mehanizam oslobađanja i dobijena dinamika oslobađanja različita (Mirza i sar., 2013).

Durofilin® 250 mg –Zdravlje, R-V, je formulacija teofilina u obliku peleta (na bazi šećernih sfera) i pretpostavlja se da je sredstvo za modifikaciju oslobađanja etilceluloza iz film obloge, koju literatura navodi kao hidrofobni polimer kod difuzijom-kontrolisanih sistema peleta, mikrosfera, obloženih granula (Gohel i sar., 1997; Ikegami i sar., 2006) vrlo kompleksnog mehanizma oslobađanja: kombinovanom istovremenom difuzijom kroz kanale koje formira plastifikator, prostore između isprepletanih polimernih lanaca i vodom ispunjene pore unutar filma (Ozturk i sar., 1990; Muschert i sar., 2009). Na brzinu oslobađanje leka utiču tip i količina plastifikatora, dužina polimernog lanca i vreme stabilizacije filma (Siepman i sar., 1999), tako da jednom formirani film obezbeđuje ravnomerno oslobađanje leka bez značajnih uticaja spoljašnjih faktora (medijuma, uslova ispitivanja). Ovim se može objasniti da su kod ovog preparata, svim primenjenim testovima ispitivanja, dobijeni vrlo slični profili, te da je formulacija vrlo robustna spram promene spoljašnjih faktora.

Nađeno slično ponašanje pri istim eksperimentalnim uslovima ispitivanja, kod proizvoda R-II Phyllocontin®-350-Purdue Pharma i R-III Phyllotemp® 225 mg-



Mundipharma objašnjava se sličnim kvalitativnim sastavom ovih proizvoda, na bazi cetostearil alkohola kao matriks formirajućeg sredstva i hidrosietil celuloze, koji grade hidrofobne porozne matrikse (Puchun i sar., 2005). Oslobođanje leka se najverovatnije ostvaruje kroz formirane pore u matriksu i krivudave kanale. Mehanizam oslobađanja lekovite supstance se opisuje prvenstveno procesom difuzije, odnosno kvazi Fick-ovom ili *Case I* kinetikom (Wong i sar., 1992; Quadir i sar., 2003; Islam i sar., 2010).

Aminofilin 350 mg-Srbolek (R-I) i Aminophyllinum 350 mg-Lek (R-IV), se zasnivaju na hidrofилnim bubrećim erodibilnim materjalima, hidrosipropilmetilcelulozi razlićitih viskoziteta. Preparat R-IV sadrži Methocel® E4M, koji pripada grupi celuloza srednjeg viskoziteta a time i sposobnosti umerenog odlaganja oslobađanja. U matriksu je prisutan i gliceril palmitostearat koji dodatno doprinosi usporavanju oslobađanja (evropski patent EP 0 284 849 B1).

Kod Aminofilin 350 mg-Srbolek, tokom ispitivanja brzine rastvaranja primećeno je drugaćije ponašanje u odnosu na Aminophyllinum 350 mg-Lek, tablete su izrazito bubrile, povećavajući znaćajno svoj volumen uz formiranje gel strukture koja je ostajala intaktna, bez pojave erozije u toku dućeg vremena ispitivanja. Ovakvo ponašanje navodi na pretpostavku da je korišćena hipromeloza izrazito visokih viskoziteta, a time se mogu objasniti naćene generalno male kolićine osloboćenog teofilina iz tableta, primenom svih testova ispitivanja, koje su iznosile 47.49 % do 56.17 %.

#### **3.1.2.2.1. Analiza profila brzine rastvaranja teofilina iz tableta primenom model-zavisnih metoda**

Brzine i difuzioni eksponent  $n$  (za karakterizaciju mehanizma oslobađanja leka), kod ispitivanih tableta i kapsula izraćunati su primenom modela kinetike nultog reda, Higuchi modela kvadratnog korena i Korsmayer - Peppas-ovog (Power law) modela (Tabela 3.1.13). Efekat odloćenog ili naglog oslobađanja (*Lag/ Burst efekat*) u prvim satima ispitivanja, tabela 3.1.14., prikazan je za Higuchi-jev model gde je postignuto najbolje uklapanje. Razlike u brzini i kinetici oslobađanja lekovite supstance potvrćuju konstatovane odnose pri prethodnoj analizi kolićina osloboćenog leka iz komercijalnih preparata.

Tabela 3.1.13. Izračunati kinetički parametri: konstante brzine rastvaranja  $k_0$ ,  $k_2$ ,  $k_p$ , koeficijent korelacije  $r^2$ , difuzioni eksponent  $n$ .

<i>Model</i>	<i>Parametri</i>	<i>Test 1USP</i>	<i>Test 3USP</i>	<i>Test 6USP</i>	<i>Test 9USP</i>	<i>Poluizmena</i>
<b>R-I</b>						
<i>Nultog reda</i>	$r^2$	0.988	0.996	0.965	0.981	0.999
	$k_0$ ( $min^{-1}$ )	0.08	0.10	0.09	0.10	0.11
<i>Higuchi model</i>	$r^2$	0.994	0.996	0.999	0.997	0.987
	$k_2$ ( $min^{-0.5}$ )	2.47	3.08	2.71	3.04	3.23
<i>Peppas ov model</i>	$r^2$	0.998	0.999	0.999	0.995	0.999
	$k_p$ ( $min^{-n}$ )	0.81	0.29	1.95	0.44	0.18
	$n$	<b>0.66</b>	<b>0.27</b>	<b>0.54</b>	<b>0.77</b>	<b>0.92</b>
<b>R-II</b>						
<i>Nultog reda</i>	$r^2$	0.985	0.985	0.939	0.977	0.961
	$k_0$ ( $min^{-1}$ )	0.14	0.16	0.12	0.16	0.17
<i>Higuchi model</i>	$r^2$	0.999	0.998	0.989	0.996	0.984
	$k_2$ ( $min^{-0.5}$ )	4.18	4.79	3.83	4.87	5.20
<i>Peppas ov model</i>	$r^2$	0.997	0.995	0.995	0.992	0.974
	$k_p$ ( $min^{-n}$ )	0.65	0.48	3.71	0.67	0.34
	$n$	<b>0.76</b>	<b>0.42</b>	<b>0.50</b>	<b>0.78</b>	<b>0.89</b>
<b>R-III</b>						
<i>Nultog reda</i>	$r^2$	0.994	0.989	0.939	0.959	0.992
	$k_0$ ( $min^{-1}$ )	0.14	0.15	0.12	0.12	0.15
<i>Higuchi model</i>	$r^2$	0.991	0.999	0.997	0.997	0.998
	$k_2$ ( $min^{-0.5}$ )	4.07	4.60	3.66	3.84	4.71
<i>Peppas ov model</i>	$r^2$	0.997	0.996	0.999	0.998	0.997
	$k_p$ ( $min^{-n}$ )	0.56	0.43	5.74	3.00	0.32
	$n$	<b>0.73</b>	<b>0.54</b>	<b>0.52</b>	<b>0.53</b>	<b>0.89</b>
<b>R-IV</b>						
<i>Nultog reda</i>	$r^2$	0.987	0.985	0.958	0.986	0.992
	$k_0$ ( $min^{-1}$ )	0.10	0.11	0.11	0.12	0.12
<i>Higuchi model</i>	$r^2$	0.999	0.999	0.996	0.999	0.996
	$k_2$ ( $min^{-0.5}$ )	2.96	3.40	3.49	3.72	3.71
<i>Peppas ov model</i>	$r^2$	0.999	0.998	0.998	0.998	0.998
	$k_p$ ( $min^{-n}$ )	0.61	0.67	3.23	0.65	0.44
	$n$	<b>0.62</b>	<b>0.67</b>	<b>0.51</b>	<b>0.74</b>	<b>0.77</b>
<b>R-V</b>						
<i>Nultog reda</i>	$r^2$	0.974	0.965	0.959	0.962	0.961
	$k_0$ ( $min^{-1}$ )	0.18	0.18	0.17	0.17	0.17
<i>Higuchi model</i>	$r^2$	0.991	0.987	0.984	0.986	0.984
	$k_2$ ( $min^{-0.5}$ )	5.70	5.50	5.48	5.27	5.20
<i>Peppas ov model</i>	$r^2$	0.981	0.978	0.979	0.978	0.991
	$k_p$ ( $min^{-n}$ )	0.29	0.37	0.59	0.44	0.39
	$n$	<b>0.93</b>	<b>0.89</b>	<b>0.82</b>	<b>0.85</b>	<b>0.89</b>

Tabela 3.1.14. Izračunati *Lag / Burst* efekat (min) kod Higuchi modela

<i>Test / parametar</i>	<i>R-I</i>	<i>R-II</i>	<i>R-III</i>	<i>R-IV</i>	<i>R-V</i>
<b><i>Test 1 USP</i></b>					
<i>Lag/Burst (min)</i>	-8.8	-17.7	-20.4	-11.9	-27.8
<b><i>Test 3 USP</i></b>					
<i>Lag/Burst (min)</i>	-17.0	-22.8	-22.5	-13.6	-23.3
<b><i>Test 6 USP</i></b>					
<i>Lag/Burst (min)</i>	3.0	2.1	7.4	0.1	-19.9
<b><i>Test 9 USP</i></b>					
<i>Lag/Burst (min)</i>	-12.7	-19.2	-2.8	-15.5	-20.7
<b><i>Metoda poluizmene</i></b>					
<i>Lag/Burst (min)</i>	-20.9	-21.3	-25.8	-18.7	-21.3

Eksperimentalni podaci se najviše uklapaju u Higuchi model ali i u Peppasov model, što ukazuje da je dominantan mehanizam oslobađanja teofilina uglavnom difuzija. Najsporija brzina je izračunata kod preparata Aminofilin 350 mg-Srbolek (2.47 -3.23, zavisno od testa), najveća za Durofilin® 250 mg –Zdravlje (5.20-5.70), a slične i niže brzine konstatovane su kod preparata na bazi poroznog matriksa R-II (3.83-5.20) i R-III (3.66-4.71).

Nađeni mehanizam oslobađanja teofilina iz preparata, uslovljen je sastavom formulacije i primenjenim testom ispitivanja, tako da se konstatuje prisustvo praktično svih načina oslobađanja.

Kod primene metode poluizmene, uglavnom je prisutan Case II transport, odnosno kinetika nultog reda ( $n = 0.89$ ), osim za preparate na bazi hipromeloze R-I ( $n = 0.92$ ) i R-IV ( $n = 0.77$ ).

Pri ispitivanju Testom 3 USP (pH = 7.5 VŽS, apar. II-lopatica) i Testom 6 USP (pH=6.6, apar. I korpica) difuzija je primarni mehanizam oslobađanja ( $n$  oko 0.5), a kod Test 3 USP: za R-I ( $n = 0.27$ ) i R-II ( $n = 0.42$ ) prisutna je i kvazi Fick-ova difuzija ( $n < 0.45$ ). Test 1 USP (pH = 6.0, apar. II-lopatica) i Test 9 USP (pH = 7.5 VCS) uglavnom obezbeđuju anomalni transport kombinovane difuzije i erozije. Iako je prethodno konstatovano, poređenjem Test 3 USP sa metodom poluizmene, Test 1 USP i Test 9 USP, da sukcesivna zamena medijuma (Test HCM), odnosno niža pH = 6,0 vrednost medijuma (Test 1 USP), kao i aparatura I (Test 9 USP) nemaju uticaja na količinu oslobođenog leka i sličnost profila, sledi da izmena uslova izvođenja ipak može

uticati na promenu mehanizma oslobađanja leka sa primarne difuzije (Test 3 USP) na kinetiku nultog reda (metoda poluizmene), odnosno anomalni transport (Test 1 USP, Test 9 USP).

Kod formulacije sa etilcelulozom obloženim peletama (R-V), ne uočava se uticaj testova, difuzioni eksponent  $n$  je bliskih vrednosti koje teže 0.89 i sistem od anomalnog transporta ( $0.45 < n < 0.89$ ) teži i dostiže kinetiku nultog reda, odnosno Case II transport.

Kod poroznih matriksa sa cetostearilalkoholom, preparati R-II i R-III, primarni mehanizam oslobađanja je difuzija lekovite supstance za Test 3 USP, Test 6 USP i Test 9 USP; odnosno kvazi Fick-ova difuzija kod R-II ( $n=0.42$ ), pri ispitivanju Testom 3 USP. Izračunate vrednosti difuzionog eksponenta su u saglasnosti sa literaturnim nalazima mehanizma prisutnog kod formulacija sa cetostearil alkoholom kao lipidnim ekscipijensom (Quadir i sar., 2003; Islam i sar., 2010). U slučaju Test 1 USP kod R-II i R-III, difuzija je kombinovana sa mehanizmom relaksacije (prisutan anomalni transport).

Preparati na bazi hipromeloze kao bubrećeg hidrofilnog polimera, R-I ( $n = 0.54-0.57$ ), R-IV ( $n = 0.51-0.77$ ), svoje oslobađanje zasnivaju na kombinovanom mehanizmu difuzije i relaksacije ( $0.45 < n < 0.89$ ), što je u saglasnosti sa nalazima literature (Siepmann i Peppas, 2001; Zuleger i sar 2001, 2002). Nešto drugačije ponašanje uočeno je kod R-I, pri ispitivanju Testom 3 USP ( $n = 0.27$ ). U literaturi, niske vrednosti difuzionog eksponenta od 0.32-0.41 nađene su u slučaju kombinacije HPMC K100M sa ksantan gumom (Modi i sar., 2010), i u opsegu 0.21-0.36 (Bendas, 2009) kod HPMC K15M matriks tableta sa diltiazem hidrohloridom, što je objašnjeno devijacijom Fick-ovog transporta koja se pripisuje formulacijama gde je više od jednog mehanizma uključeno u oslobađanje.

Uočeno je prisustvo naglog (*Burst*) efekta (negativne vrednosti odsečka na x-osi), oslobađanja teofilina u toku prvog sata ispitivanja, kod svih preparata. Uočeno ponašanje, navodi na pretpostavku postojanja nepotpuno formiranih gel barijera za kontrolu dinamike oslobađanja leka (kod hidrofilnih bubrećih matriksa), pa se lekovita supstanca oslobađa brže sa površine tableta, odnosno kod lipidnog poroznog matriksa i hidrofobnog filma usled još ne uspotavljenog stanja ravnotežne koncentracije lekovite supstance između matriksa i okolnog medijuma.

Analiza komercijalnih proizvoda primenom različitih *in vitro* testova ispitivanja pokazala je, da na uočeno različito ponašanje preparata i oslobađanje teofilina, primarni uticaj ima sama formulacija odnosno razlike u tehnološkim rešenjima, primenjenim pomoćnim supstancama i proizvodnim postupcima za postizanje modifikovanog oslobađanja teofilina.

Najrobustnijom se pokazala formulacija na bazi etilcelulozom obloženih peleta tako da su svim primenjenim testovima ispitivanja, dobijeni vrlo slični profili uz oslobađanje leka kinetikom koja teži ili odgovara Case II transportu, odnosno kinetici nultog reda.

Kompletno i najbrže oslobađanje leka je kod preparata na bazi etilcelulozom obloženih peleta, u količini od preko 90 % kod svih testova ispitivanja; dok je nekompletno i najsporije oslobađanje pokazao preparat na bazi hidroksipropilmetilceluloze oslobodivši 47 % do 56 % leka (zavisno od testa); srednje brzine i dinamiku oslobađanja od 72 % do 85 % u zavisnosti od testa pokazala su dva preparata na bazi lipidno-voskastog poroznog matriksa (cetostearilalkohola u prisustvu hidroksietilceluloze); različita dinamika oslobađanja (od 54 % do 74 %) značajno uslovljena testom i načinom izvođenja ispitivanja nađena je kod preparata na bazi hidroksipropilmetilceluloze i glicerilpalmitostearata.

Sukcesivna zamena medijuma u toku vremena, kao glavna prednost i preporuka metode poluizmene, pokazala se u našem slučaju i na ispitivanim uzorcima da nema uticaja na profil oslobađanja već je potpuno prihvatljivo sprovesti kompletnu zamenu medijuma nižeg pH posle prvog sata ispitivanja medijumom više pH vrednosti (Test 3 USP).

Uočeno prisustvo naglog oslobađanja teofilina u toku prvog sata ispitivanja, kod svih ispitivanih preparata, navodi na pretpostavku postojanja nepotpuno formiranih gel barijera za kontrolu dinamike oslobađanja leka, pa se lekovita supstanca oslobađa brže sa površine tableta, odnosno kod lipidnog poroznog matriksa i hidrofobnog filma usled još ne uspotavljenog stanja ravnotežne koncentracije lekovite supstance između matriksa i okolnog medijuma.

### 3.1.3. Ispitivanje brzine rastvaranja teofilina iz komercijalnog preparata sa trenutnim oslobađanjem

#### 3.1.3.1. Metode

Za potpunije sagledavanje uticaja sastava i pH vrednosti medijuma na dinamiku oslobađanja teofilina, dodatna ispitivanja su sprovedena na komercijalnom preparatu sa trenutnim oslobađanjem. Na ovaj način je isključen uticaj same formulacije i prisutnih pomoćnih materija na modifikovanje brzine rastvaranja leka.

Za ispitivanje su izabrani medijumi, USP oficinalni, koji su bili korišćeni u prethodnim ispitivanjima komercijalnih preparata sa modifikovanim oslobađanjem u obliku tableta i kapsula. Dodatno je priključen i medijum pH 3.0 fosfatni pufer USP, u okviru Test 4 USP, kako bi se sagledalo oslobađanje unutar opsega pH 1.2 – 7.5 .

Pregled medijuma, kao i eksperimentalnih uslova izvođenja ispitivanja dat je u tabeli 3.1.15.

Tabela 3.1.15. Pregled korišćenih medijuma i eksperimentalnih uslova *in vitro* ispitivanja

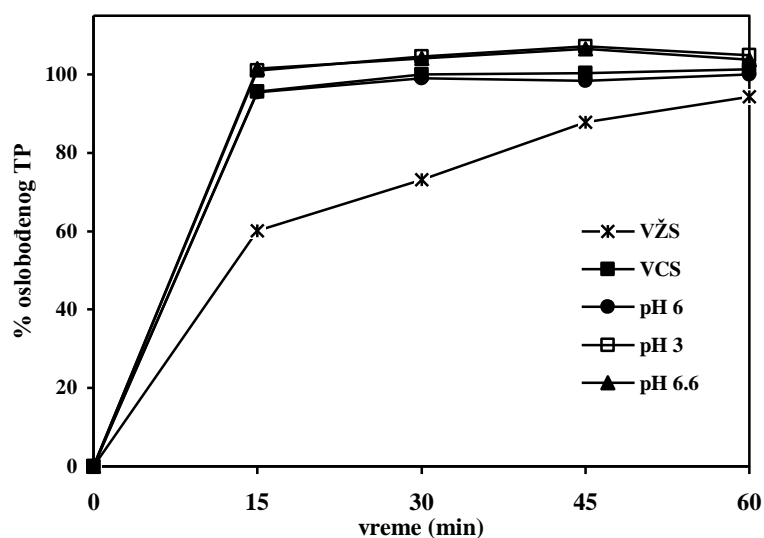
<i>medijum</i>	<i>uslovi izvođenja testa</i>	<i>USP Test</i>
<i>veštački želudačni sok bez pepsina, pH 1.2 (VŽS)</i>	<i>Aparatura II (paddle)</i> <b>50 rpm, 900 ml</b>	<b><i>Test 1 USP, Test 3 USP, metoda poluizmene,</i></b>
<i>veštački crevni sok bez enzima, pH 7.5 (VCS)</i>		<b><i>Test 3 USP, Test 9 USP, metoda poluizmene</i></b>
<i>pH 6.0 fosfatni pufer USP</i>		<b><i>Test 1 USP,</i></b>
<i>pH 3.0 fosfatni pufer USP</i>		<b><i>Test 4 USP</i></b>
<i>0.05M pH 6.6 fosfatni pufer USP</i>	<i>Aparatura I (basket),</i> <b>100 rpm, 1000 ml</b>	<b><i>Test 6 USP</i></b>

### 3.1.3.2. Rezultati i diskusija

Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja teofilina iz preparata sa trenutnim oslobađanjem u ispitivanim medijumima prikazani su tabelarno (tabela 3.1.16.) i grafički (slika 3.1.12.), a izračunati faktor sličnosti i razlike u tabeli 3.1.17.

Tabela 3.1.16. Brzine oslobađanja teofilina iz komercijalnih aminofilin tableta sa trenutnim oslobađanjem u različitim medijumima

vreme (min)	VŽS		VCS		pH 6.0 fosfatni pufer		pH 3.0 fosfatni pufer		pH 6.6 fosfatni pufer	
	%	Sd	%	Sd	%	Sd	%	Sd	%	Sd
15	60.14	4.14	95.59	2.68	95.43	1.24	100.93	2.51	101.43	2.89
30	73.13	5.44	99.99	2.35	99.00	1.62	104.52	1.67	104.1	3.46
45	87.84	5.13	100.40	1.84	98.45	1.94	107.18	0.99	106.50	1.55
60	94.30	5.40	101.37	2.01	100.09	4.42	104.86	1.25	103.69	1.89



Slika 3.1.12. Profili brzine rastvaranja teofilina iz komercijalnih aminofilin tableta sa trenutnim oslobađanjem u različitim medijumima

Poređenjem rezultata dobijenih ispitivanjem brzine rastvaranja teofilina iz preparata sa trenutnim oslobađanjem u medijumima različite pH vrednosti, može se uočiti da je

posle 15 min kod svih medijuma sa  $\text{pH} \geq 3.0$  postignuto oslobađanje od oko 95 % leka, dok je u medijumu niske pH vrednosti (VŽS,  $\text{pH}=1.2$ ) oslobođeno oko 60% teofilina. Izračunati faktor sličnosti i razlike takođe pokazuju sličnost svih profila u višim pH medijumima (tabela 3.1.17.). Manje oslobađanje u toku prvih 30 do 45 min, moglo bi se pripisati uticaju medijuma niske pH vrednosti, te je stoga korisno da ovaj medijum bude primenjen i kod ispitivanja preparata sa modifikovanim oslobađanjem.

Tabela 3.1.17. Faktor sličnosti i razlike kod profila oslobađanja teofilina dobijenih ispitivanjem aminofilin tableta sa trenutnim oslobađanjem u različitim medijumima

<i>Test</i>	<i>f1</i>	<i>f2</i>	<i>Test</i>	<i>f1</i>	<i>f2</i>
VŽS / VCS	63.2	38.1	VCS / pH 6.6	5.6	<b>62.1</b>
VŽS / pH 6	18.4	38.3	VCS / pH 3	4.8	<b>65.5</b>
VŽS / pH 6.6	25.8	33.6	pH 6 / pH 6.6	6.3	<b>60.4</b>
VŽS / pH 3	25.5	33.5	pH 6 / pH 3	6.0	<b>63.1</b>
VCS / pH 6	2.1	<b>65.5</b>	pH 3 / pH 6.6	1.8	<b>82.7</b>

Na osnovu prethodnih rezultata ispitivanja i konstatovanog ponašanja leka pri niskoj pH vrednosti medijuma na oslobađanje teofilina, a u cilju postizanja veće selektivnosti in vitro testa ispitivanja brzine oslobađanja prototip formulacija, usvojena je primena 2 medijuma, niže (VŽS,  $\text{pH}1.2$ ) i više (VCS,  $\text{pH}7.5$ ) pH vrednosti. VCS je odabran, pošto su konstatovane sličnosti u oslobađanju teofilina, u opsegu  $\text{pH} = 3.0-7.5$ , a po sastavu je biološki najpribližniji i najprihvatljiviji.

Navedena kombinacija medijuma je bila u upotrebi od strane i Simons i sar, 1982 kod teofilin tableta sa produženim oslobađanjem, ali se razlikuje od kombinacije primenjene od strane većine autora pri ispitivanju ove grupe preparata:  $\text{pH}=1.2$  VŽS/0.1N HCl i  $\text{pH}=6.8$  fosfatni pufer (Möller i Langenbucher, 1982; Miyazaki i sar, 2003; Ikegami i sar., 2006; Sakuma i sar., 2009; Emeje i sar., 2012).

Shodno rezultatima takođe, nije potrebna sukcesivna zamena medijuma u toku vremena, već je potpuno u saglasnosti sprovesti kompletnu zamenu medijuma nižeg pH posle prvog sata ispitivanja medijumom više pH vrednosti. Korišćeni farmakopejski testovi



prvenstveno su bili bazirani na aparaturi II USP rotirajuće lopatice, izuzev Test 6 (aparatura I USP rotirajuće korpice). Stoga je potrebna analiza uticaja tipa aparature, radi utvrđivanja najpovoljnijeg *in vitro* testa ispitivanja, obzirom da oficinalni test za ispitivanje brzine rastvaranja teofilina iz tableta sa modifikovanim oslobađanjem nije na raspolaganju.

### **3.1.4. Uticaj eksperimentalnih uslova i fizičkih atributa (veličina / oblik) kvaliteta tableta na brzinu oslobađanja teofilina**

#### **3.1.4.1. Metode**

##### **3.1.4.1.1. *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja pri različitim eksperimentalnim uslovima**

Za ispitivanje uticaja brzine mešanja na oslobađanje teofilina iz tableta, *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja teofilina iz matriks tableta je izvođeno u aparaturi I USP sa rotirajućom korpicom, u 900 ml medijuma i pri temperaturi od  $37 \pm 2$  °C. Kao medijum u toku prvog sata ispitivanja korišćen je veštački želudačni sok bez pepsina pH 1.2, a potom je ispitivanje u intervalu od 2-8h nastavljeno u veštačkom crevnom soku bez enzima pH 7.5. Primenjene su brzine mešanja: 50 rpm, 75 rpm i 100 rpm, u skladu sa literaturom preporučenim opsegom brzine mešanja 50 rpm – 100 rpm kod aparature I USP sa rotirajućom korpicom (CDER, 2003; EMA, 2010).

Za ispitivanje uticaja aparature na oslobađanje teofilina iz tableta, *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja teofilina iz matriks tableta je izvođeno u aparaturi I USP sa rotirajućom korpicom i aparaturi II USP sa rotirajućom lopaticom, pri brzini mešanja od 50 rpm. Korišćeno je 900 ml medijuma (veštački želudačni sok bez pepsina pH 1.2 u toku prvog sata i od 2-8h nastavljeno veštački crevni sok bez enzima pH 7.5), pri temperaturi od  $37 \pm 2$  °C.

U svim ispitivanjima analizirane su tablete dva različita oblika (okruglog, bikonveksnog oblika, prečnika 11mm i ovalnog oblika 15 mm x 7 mm), izrađene na u tom trenutku raspoloživim alatima, a prema postupku izrade opisanom u odeljku 3.1.1.2.2.

##### **3.1.4.1.2. Dizajn eksperimenta**

Kod ispitivanja uticaja brzine mešanja (pri izvođenju *in vitro* testa), na oslobađanje teofilina iz tableta dve formulacije su pripremljene u skladu sa punim faktorijalnim dizajnom. Varirane su dve promenljive, jedna na dva a druga na tri nivoa, što čini šest eksperimentalnih kombinacija. Svi eksperimenti su izrađeni u triplikatu, što predstavlja ukupno 18 eksperimenata.

Nezavisno promenljive su varirane po nivoima, koji su za oblik tablete iskazani kao odnos dužina/širina, što kod okruglih bikonveksnih tableta iznosi 1.0 (11 mm / 11 mm), a kod ovalnih tableta 2.5 (15 mm / 7 mm):

$X_1$ : brzina rotacije (50 rpm, 75 rpm i 100 rpm)

$X_2$ : oblik tableta (1, 2.5)

Kao zavisno promenljive su odabrane:

$Y_{4h}$ : procenat oslobođenog teofilina nakon 4h ispitivanja

$Y_{7h}$ : procenat oslobođenog teofilina nakon 7h ispitivanja

$Y_k$ : konstanta brzine nultog reda

Konstanta brzine nultog reda  $k_0$ , izračunata je prema jednačini 5, modelom kinetike nultog reda.

Plan eksperimenta je prikazan tabelom 3.1.18.

Tabela 3.1.18. Plan eksperimenta punog faktorijalnog dizajna, realne i kodirane vrednosti nezavisno promenljivih, za eksperimente R1-R18

Eksperiment	$X_1$	brzina rotacije/rpm	$X_2$	oblik tableta mm
R 1	-1	50	-1	1.0
R 2	-1	50	-1	1.0
R 3	-1	50	-1	1.0
R 4	-1	50	+1	2.5
R 5	-1	50	+1	2.5
R 6	-1	50	+1	2.5
R 7	0	75	-1	1.0
R 8	0	75	-1	1.0
R 9	0	75	-1	1.0
R 10	0	75	+1	2.5
R 11	0	75	+1	2.5
R 12	0	75	+1	2.5
R 13	+1	100	-1	1.0
R 14	+1	100	-1	1.0
R 15	+1	100	-1	1.0
R 16	+1	100	+1	2.5
R 17	+1	100	+1	2.5
R 18	+1	100	+1	2.5

Kod obrade rezultata najpre se programski kroz Design Expert® softver sprovodi procena optimalnog matematičkog modela koji će najbolje opisati vezu između nezavisno i zavisno promenljivih, na osnovu poređenja nekoliko statističkih parametara: standardne devijacije ( $Sd$ ), multipnog korelacionog koeficijenta ( $R^2$ ), prilagođenog multipnog korelacionog koeficijenta ( $Adjusted R^2$ ), predviđene rezidualne sume kvadrata ( $PRESS$ ).  $PRESS$  posebno pokazuje koliko model odgovara podacima i poželjno je da ima najmanju vrednost u odnosu na ostale modele koji se razmatraju.

Dobijeni statistički parametri su pokazali da je za analizu prihvatljiv dvofaktorski model interakcija ( $2FI$ ).

Uticao nezavisno promenljivih na zavisno promenljive, potom je statistički određen kroz izračunavanje vrednosti faktora verovatnoće, ( $p$ , *probability factor*), čija vrednost ukoliko je  $p < 0.05$  ukazuje na značajnost uticaja nezavisno promenljivih na neku od zavisno promenljivih.

Rezultati su metodom višestruke regresije uklapani u matematički model I reda (jednačina 9), kako bi se dobili koeficijenti uticaja promenljivih:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 \quad (9)$$

#### **3.1.4.2. Rezultati i diskusija**

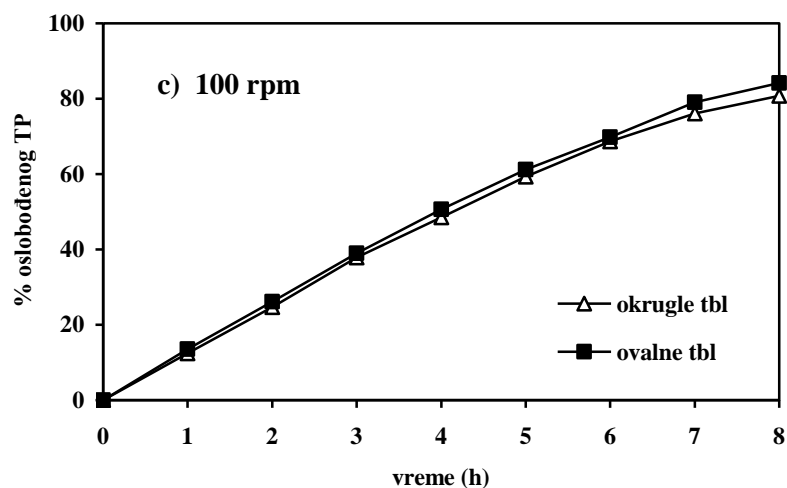
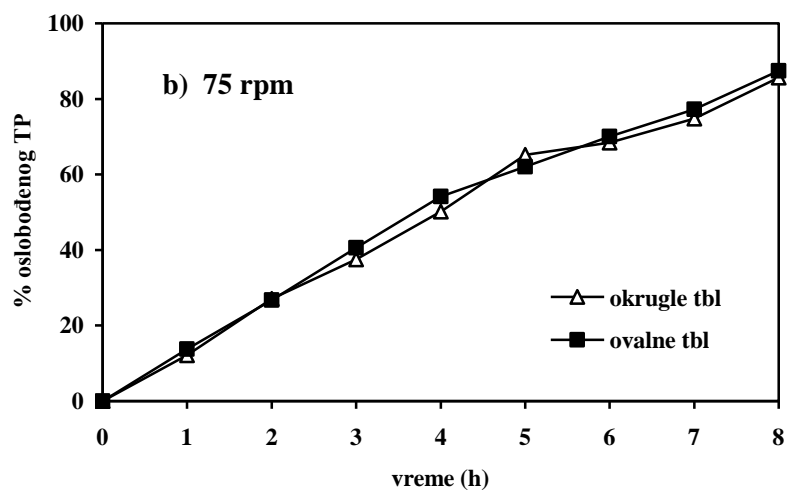
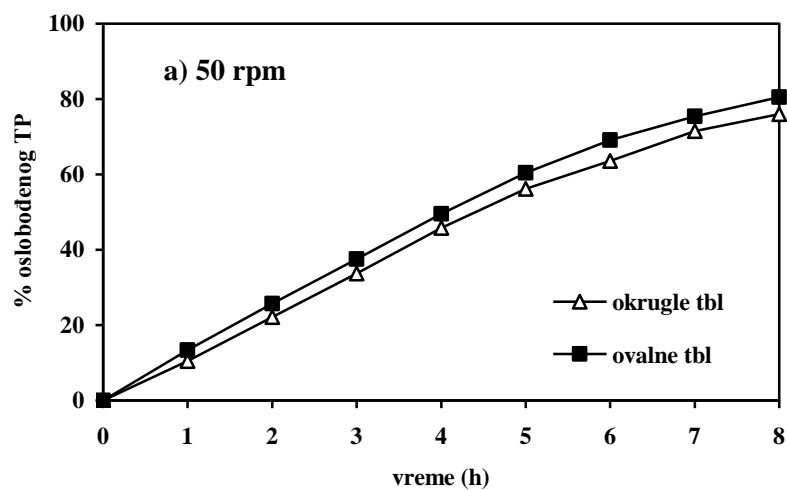
Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja teofilina u toku 8h, prema planu eksperimenata, pri različitim brzinama mešanja u aparaturi I USP rotirajuće korpice prikazani su tabelarno (tabela 3.1.19.).

Grafički su prikazane (slika 3.1.13. i 3.1.14.) srednje vrednosti brzine oslobađanja za tri replikata.

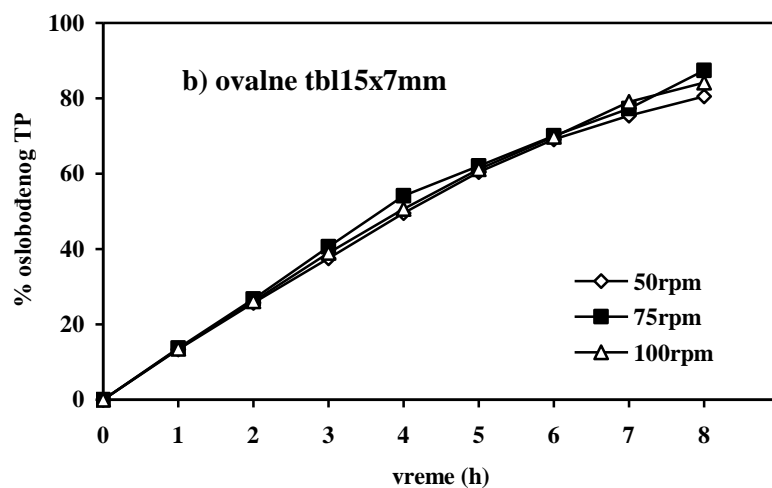
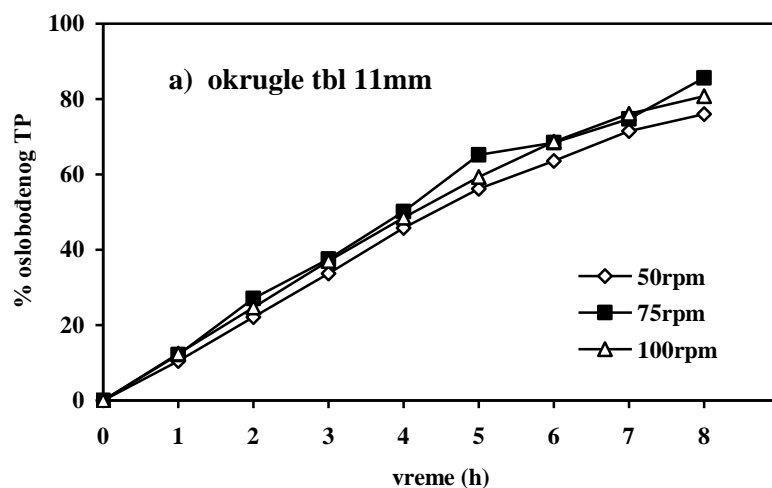
Izračunati faktor sličnosti kod dobijenih profila oslobađanja dat je u tabeli 3.1.20.

Tabela 3.1.19. Brzine rastvaranja teofilina prema planu eksperimenta punog faktorijalnog dizajna iz R1-R18

Vreme (h)	Eksperiment																	
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R15	R16	R17	R18
1	11.1	9.9	10.3	13.9	13.6	12.7	12.1	12.3	12.16	13.5	14.0	13.7	12.7	11.9	12.5	13.9	14.3	12.5
2	22.8	21.9	21.6	26.2	25.9	24.8	26.7	27.3	27.9	26.4	26.5	27.3	24.7	25.0	24.3	26.9	26.5	25.1
3	34.1	33.8	33.3	38.7	37.4	36.4	36.9	38.3	37.4	41.9	39.1	40.8	36.5	37.7	39.4	40.4	39.3	37.3
4	46.0	45.7	45.8	50.2	49.5	48.8	51.6	49.0	49.7	53.8	52.9	55.7	47.9	49.6	48.1	51.9	50.5	49.5
5	55.5	56.1	57.0	62.1	60.5	58.5	64.6	64.7	66.1	62.9	60.9	62.3	58.7	60.2	58.9	62.7	60.9	59.9
6	62.7	63.8	64.1	71.3	69.4	66.7	67.9	67.6	69.8	70.2	69.2	70.8	67.8	69.6	68.5	71.5	69.2	68.7
7	69.9	71.3	73.1	76.7	76.3	73.2	74.6	73.7	75.9	78.4	76.5	76.9	75.9	77.3	75.0	79.3	79.6	78.4
8	75.2	74.9	77.9	82.5	81.7	77.3	85.7	84.6	86.6	87.8	87.8	86.8	79.8	82.5	79.9	84.1	84.0	83.5



Slika 3.1.13. Profili brzine rastvaranja teofilina iz okruglih i ovalnih tableta u aparaturi I USP rotirajuće korpice, pri različitim brzinama mešanja: a) 50 rpm, b) 75 rpm c) 100 rpm



Slika 3.1.14. Profili brzine rastvaranja teofilina iz okruglih (a) i ovalnih tableta (b) u aparaturi I USP rotirajuće korpice, pri brzini mešanja 50 rpm, 75 rpm, 100 rpm

Tabela 3.1.20. Faktor sličnosti f2 kod profila, dobijenih u aparaturi I pri brzini mešanja 50rpm, 75rpm, 100rpm

Okrugle Ø 11 mm f2	Ovalne 15 x 7 mm f2	Okrugle tbl nasuprot Ovalne tbl f2
<i>okrugle 50rpm/ okrugle 75rpm</i>	<i>ovalne 50rpm/ ovalne 75rpm</i>	<i>okrugle 50rpm/ ovalne 50rpm</i>
65.0	80.5	69.1
<i>okrugle 50rpm/ okrugle 100rpm</i>	<i>ovalne 50rpm/ ovalne 100rpm</i>	<i>okrugle 75rpm/ ovalne 75rpm</i>
70.7	86.0	78.9
<i>okrugle 75rpm/ okrugle 100rpm</i>	<i>ovalne 75rpm/ ovalne 100rpm</i>	<i>okrugle 100rpm/ ovalne 100rpm</i>
79.5	86.1	84.6

Pri poređenju rezultata dobijenih primenom različitih brzina mešanja, kod oba oblika tableta, veće količine se oslobađaju pri brzini 75 rpm, a manje i slične količine pri brzinama mešanja od 50 rpm i 100 rpm.

Za iste eksperimentalne uslove mešanja, tablete ovalnog oblika pokazuju oslobađanje nešto veće količine leka nego okrugle bikonveksne tablete.

Najviše količine leka se iz ovalnih tableta oslobađa kod ispitivanju pri brzini mešanja 75 rpm.

Uprkos izvesnih razlika u količini oslobođenog leka pri istim eksperimentalnim uslovima, izračunat faktor sličnosti (tabela 3.1.20.) za sve dobijene profile je od 65-86.1, na osnovu čega sledi da su poređeni profili slični, te da raspoložive geometrije alata nemaju značajnog uticaja na brzinu rastvaranja teofilina iz tableta.

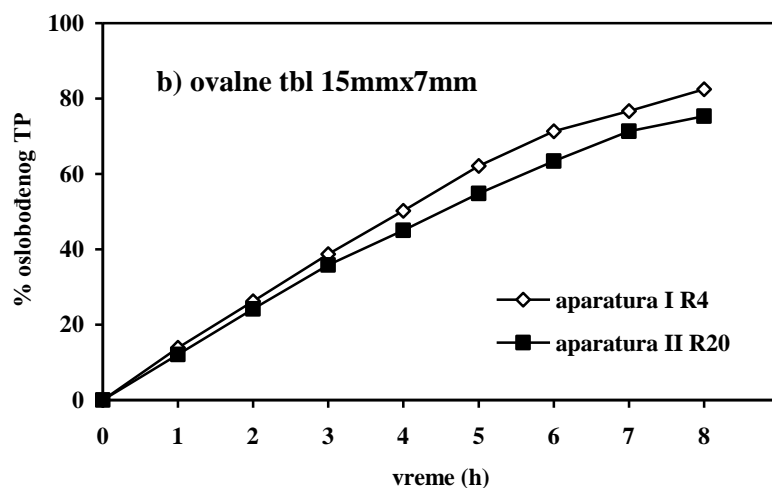
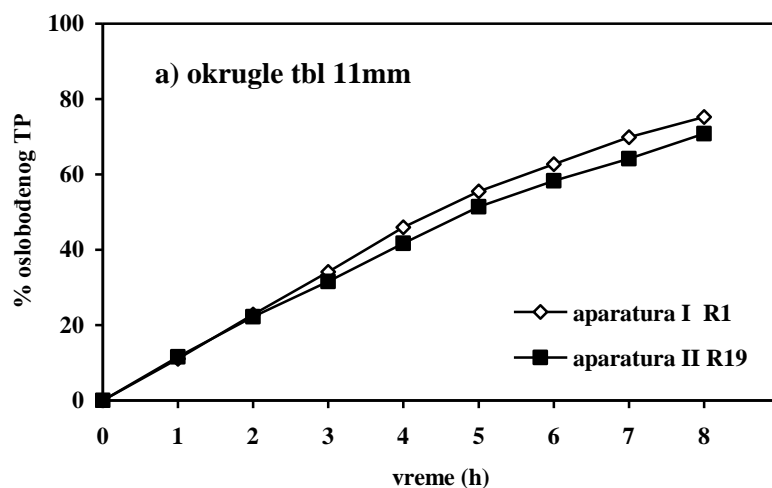
U okviru dela ispitivanja koje se odnosi na uticaj aparature I USP rotirajuće korpice i aparature II USP rotirajuće lopatice, na oslobađanje teofilina iz tableta različitih oblika (okrugle i ovalne), kod pripremljenih uzoraka tableta ispitana je brzina oslobađanja teofilina u aparaturi II, pri 50 rpm, sa okruglim tabletama (eksperiment R19) i ovalnim tabletama (eksperiment R20) i dobijeni profili oslobađanja prikazani su u tabeli 3.1.21.

Tabela 3.1.21. Brzine rastvaranja teofilina pri ispitivanju u aparaturi II i brzini 50rpm, za okrugle i ovalne tablete, eksperimenti R19-R20

Vreme / h	Eksperimenti	
	R19 (Ø 11 mm )	R20 (15 mm x 7 mm)
1	11,57	12,07
2	22,23	24,14
3	31,60	35,81
4	41,69	45,00
5	51,37	54,80
6	58,33	64,43
7	64,16	71,30
8	70,77	75,32

Uporedni pregled profila kod okruglih i ovalnih tableta dobijenih sa aparaturom I (R1, R4) i aparaturom II (R19, R20) pri brzini 50rpm dat je na slici 3.1.15.





Slika 3.1.17. Profili brzine rastvaranja teofilina u aparaturi I i aparaturi II, pri brzini mešanja 50 rpm iz okruglih (a) i ovalnih tableta (b),

Količina oslobođenog teofilina iz okruglih i ovalnih tableta, dobijena pri ispitivanju u aparaturi I USP (rotirajuća korpica) je većih vrednosti u poređenju sa rezultatima iz aparature II (USP rotirajuća lopatica).

Međutim, izračunati faktor sličnosti  $f_2$  između okruglih tableta u aparaturi I (R1) i aparaturi II (R19) iznosi 68.2 odnosno kod ovalnih tableta u aparaturi I (R4) i aparaturi II (R20) iznosi 68.7 što ipak ukazuje da se profili među sobom ne razlikuju značajno.

### 3.1.4.2.1. Analiza profila brzine rastvaranja teofilina iz tableta primenom model-zavisnih metoda

Uklapanjem profila u matematičke modele proizilazi da teže modelu kinetike nultog reda, mada se uklapaju i u Higuchi-jev i Peppasov model (tabela 3.1.22).

Tabela 3.1.22. Izračunati kinetički parametri konstante brzine rastvaranja  $k_0$ ,  $k_2$ ,  $k_p$ , koeficijent korelacije  $r^2$ , *Lag/Burst* efekat, difuzioni eksponent  $n$ .

<i>Model</i>	<i>Parametri</i>	<u>Aparatura I okrugle tbl</u> <u>50,75,100rpm</u>			<u>Aparatura I ovalne</u> <u>tbl 50,75,100rpm</u>			<u>Aratura II</u> <u>okrugle, ovalne tbl</u>	
		<b>R1</b>	<b>R7</b>	<b>R13</b>	<b>R4</b>	<b>R10</b>	<b>R16</b>	<b>R19</b>	<b>R20</b>
<i>Nultog reda</i>	$r^2$	0,993	0,985	0,993	0,991	0,986	0,92	0,994	0,993
	$k_0$ ( $min^{-1}$ )	0,186	0,213	0,205	0,212	0,220	0,205	0,164	0,187
	Lag/Burst (min)	4,2	7,7	6,1	7,2	9,3	7,3	5,7	6,4
<i>Higuchi model</i>	$r^2$	0,997	0,994	0,998	0,997	0,997	0,998	0,998	0,998
	$k_0$ ( $min^{-1}$ )	4,86	5,06	4,90	4,97	5,08	5,11	4,29	4,65
	Lag/Burst (min)	-29,4	-27,1	-28,7	-27,1	-25,4	-28,0	-23,8	-25,6
<i>Peppas ov model</i>	$r^2$	0,994	0,991	0,996	0,996	0,993	0,996	0,998	0,997
	$k_0$ ( $min^{-1}$ )	0,19	0,29	0,28	0,36	0,38	0,36	0,32	0,32
	Lag/Burst (min)	3,2	4,3	2,8	2,6	3,9	2,6	1,6	2,4
	<b><math>n</math></b>	<b>0,97</b>	<b>0,91</b>	<b>0,92</b>	<b>0,88</b>	<b>0,87</b>	<b>0,89</b>	<b>0,88</b>	<b>0,89</b>

Pri ispitivanju u aparaturi I, izračunate brzine imaju više vrednosti kod ispitivanja brzinom mešanja 75 rpm, a manje i slične pri druge dve brzine. Kod okruglih biconveksnih tableta vrednost  $n= 0.91-0.97$ , te je proces relaksacije dominantan u oslobađanju leka. Izračunate vrednosti difuzionog eksponenta, kod ovalnih tableta su u opsegu 0.87-0.89, ukazujući da se lek oslobađa mehanizmom Case II transporta, odnosno kinetikom nultog reda.

Poređenjem brzina oslobađanja dobijenih posle ispitivanja u aparaturi II, sledi da se lek sporije oslobađa iz okruglih tableta nego iz ovalnih pri istim brzinama mešanja. Izračunate vrednosti difuzionog eksponenta, kod okruglih i ovalnih tableta su slične 0.88 i 0.89, ukazujući da se lek oslobađa na sličan način mehanizmom Case II transporta, odnosno kinetikom nultog reda.

Poređenjem mehanizam oslobađanja kod okruglih tableta ispitivanih u aparaturi I ( $n=0,97$ ), sledi da proces relaksacije preovladava u oslobađanju leka, za razliku od aparature II gde je prisutan Case II transporta, odnosno kinetika nultog reda ( $n=0,88$ ).

### 3.1.4.2.2. Analiza faktorskih efekata

Statističkom analizom u okviru korišćenog softvera, pokazalo se da se uticaj nezavisno promenljivih (brzine mešanja i oblika tableta) na oslobađanje leka posle 4h, 7h i  $k_0$  konstantu brzine oslobađanja kinetikom nultog reda, može analizirati primenom dvofaktorskog modela interakcija 2FI. Primenom ovog modela dobijen je faktor verovatnoće ( $p$ ) koji opisuje stepen značajnosti uticaja nezavisno promenljivih na zavisno promenljive (tabela 3.1.23.).

Tabela 3.1.23. Pregled statističke značajnosti uticaja brzine mešanja ( $X_1$ ) i oblika tableta ( $X_2$ ) na oslobađanje leka posle 4h, 7h i na konstantu brzine oslobađanja kod eksperimenata R1-R18

<b>Model 2FI</b>	<b><i>p</i></b>
<b><i>Oslobađanje posle 4h, <math>Y_{4h}</math></i></b>	
<i>X1</i>	0,144
<i>X2</i>	<b>0,006</b>
<i>X1 x X2</i>	0,532
<b><i>Oslobađanje posle 7h, <math>Y_{7h}</math></i></b>	
<i>X1</i>	<b>0,000</b>
<i>X2</i>	<b>0,000</b>
<i>X1 x X2</i>	0,517
<b><i>Konstanta brzine <math>Y_{k_0}</math></i></b>	
<i>X1</i>	0,189
<i>X2</i>	0,149
<i>X1 x X2</i>	0,604

Rezultati ukazuju da je uticaj brzina mešanja na oslobađanje leka više izražen u kasnijoj fazi ispitivanja, posle 7h ( $p<0.000$ ), dok razlika u obliku tablete može uticati na oslobađanje i posle 4h ( $p<0.006$ ) i posle 7h ( $p<0.000$ ) oslobađanja leka. Pri tome oba parametra nemaju statistički značajan uticaj na konstantu brzine oslobađanja.

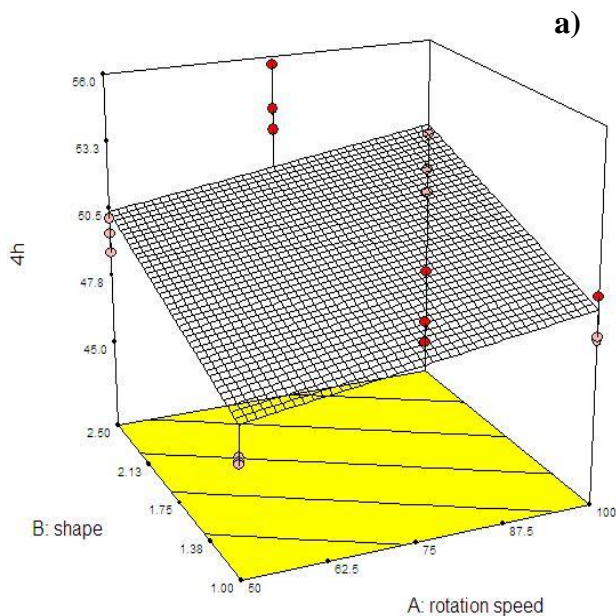
Uticaji brzine mešanja ( $X_1$ ) i oblika tableta ( $X_2$ ) na oslobađanje leka posle 4h, 7h i na konstantu brzine oslobađanja prikazani su i grafički na slici 3.1.16.

Design-Expert® Software

4h



X1 = A: rotation speed  
X2 = B: shape

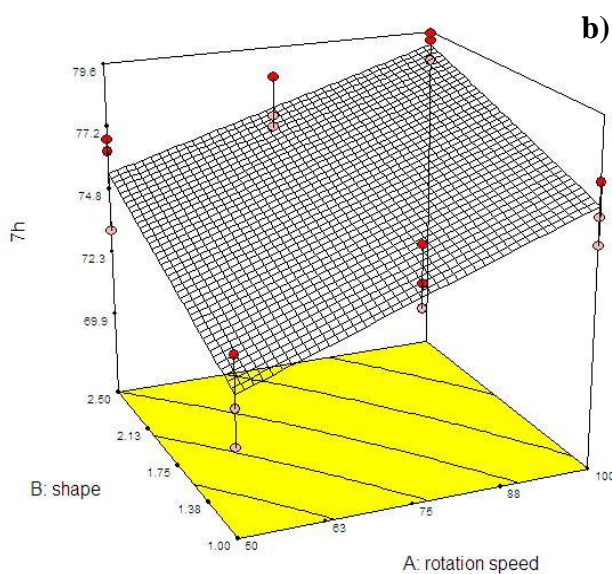


Design-Expert® Software

7h

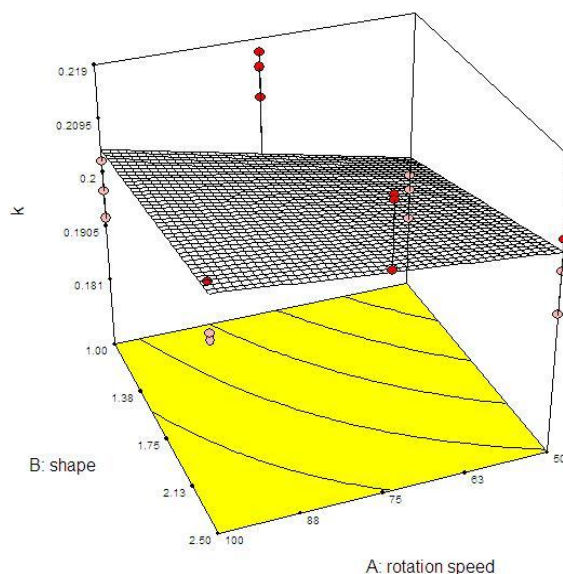


X1 = A: rotation speed  
X2 = B: shape



Slika 3.1.16. Površina odgovora koja prikazuje uticaj brzine mešanja kod aparature I tipa korpice i oblika tablete na oslobađanje teofilina iz matriks tableta posle 4h (a) i 7h (b) ispitivanja

k  
 0.2184  
 0.1812  
 X1 = A: rotation speed  
 X2 = B: shape



c)

Slika 3.1.16. (nastavak) Površina odgovora koja prikazuje uticaj brzine mešanja kod aparature I tipa korpice i oblika tablete na konstantu brzine oslobađanja teofilina iz matriks tableta (c)

Dobijeni rezultati ispitivanja kod eksperimenata R1-R18 su metodom višestruke regresije uklapani u matematički model I reda (jednačina 9), a dobijeni regresioni koeficijenti modela kao odgovor na  $Y_{4h}$ ,  $Y_{7h}$  prikazani su jednačinama 10-11 i grafički na slici 3.1.17.

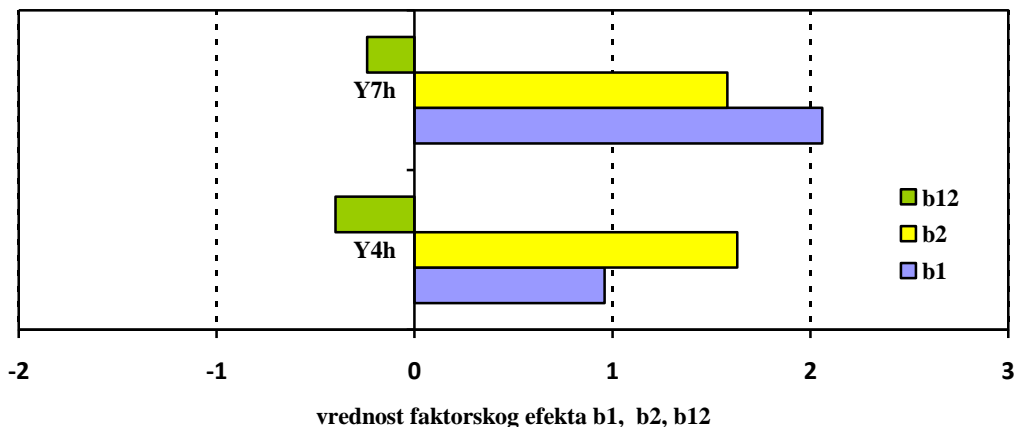
$$Y_{4h} = 49.08 + 0.96 X_1 + 1.63 X_2 - 0.40 X_1 X_2 \quad (10)$$

$$Y_{7h} = 75.69 + 2.06 X_1 + 1.58 X_2 - 0.24 X_1 X_2 \quad (11)$$

Svi regresioni koeficijenti uz  $X_1$  i  $X_2$  imaju pozitivan predznak što ukazuje da oba faktora direktno proporcionalno utiču na brzinu oslobađanja teofilina iz tableta.

Oblik tablete ima sličan, odnosno konstantan uticaj na oslobađanje leka i posle 4h i posle 7h ispitivanja, dok se efekat brzine mešanja na oslobađanje povećava u toku vremena. To se verovatno može pripisati ubrzanju hidrodinamičkih uslova kretanja medijuma oko korpice, čime se remeti uspostavljeni koncentracioni gradijent leka između kontaktne površine tablete i medijuma, i pojačava difuzija iz matriksa usled narušenog koncentracionog gradijenta.

Dobijene vrednosti za koeficijent,  $b_{12}$ , koji opisuje uticaj interakcije faktora praktično je bez uticajem na oslobađanje leka.



Slika 3.1.17. Vrednosti regresionih koeficijenata na odgovor  $Y_{4h}$ ,  $Y_{7h}$

Na osnovu dobijenih rezultata svih *in vitro* ispitivanja sledi da su pri brzini mešanja od 50 rpm dobijeni slični profili oslobađanja pri primeni aparature I USP rotirajuće korpice i aparature II USP rotirajuće lopatice.

Pri brzini mešanja 75 rpm kod aparature I, kod oba oblika tableta, nešto više brzine oslobađanja su uočene, dok su za manje (50rpm) i veće brzine mešanja (100rpm) nađeni slični profili oslobađanja teofilina ( $F2 > 50$ ).

Rezultati ukazuju na opravdanost primene brzine mešanja 50 rpm kod aparature II USP u daljim ispitivanjima, što je u saglasnosti i sa zvaničnim regulatornim preporukama (CDER, 2003; EMA, 2010).

Za iste eksperimentalne uslove, tablete ovalnog oblika pokazuju oslobađanje nešto veće količine leka nego okrugle, bikonveksne tablete. Međutim izračunati faktor sličnosti kod tableta različite geometrije a istog satava, potvrđuje sličnost profila ( $f2 = 65-86.1$ ), te proizilazi da između raspoloživih korišćenih geometrija i dimenzija alata nema značajnog uticaja na razlike u brzini rastvaranja teofilina iz tableta na bazi hidroksipropilmetilceluloznog matriksa (Siepmann i sar., 1999; Karasulu i sar., 2000).

## **3.2. FARMACEUTSKO - TEHNOLOŠKA ISPITIVANJA HIDROFILNIH MATRIKS SISTEMA NA BAZI HPMC I KARBOMERA**

U drugom delu istraživanja su prikazana ispitivanja koja se odnose na razvoj i odabir prototip formulacija sličnih profila oslobađanja kao kod dva odabrana komercijalna proizvoda, čiji će kvalitet dalje biti potvrđen kroz planiranu preliminarnu *in vivo* studiju bioraspoloživosti na životinjama.

### **3.2.1. Materijali i metode**

#### **3.2.1.1. Materijali**

Sledeći materijali su korišćeni u ispitivanjima:

- aminofilin monohidrat (BASF, Germany), aktivna supstanca;
- hidroksipropilmetilceluloza, Methocel® K100M Premium EP ili Methocel® K4M Premium EP (Colorcon, UK), kao matriks formirajuće sredstvo;
- karbomer, Carbopol® 971P NF (Lubrizol, Italy), kao drugo matriks formirajuće sredstvo;
- polivinil pirolidon, Kolidon® K-30 (BASF, Germany), kao vezivno sredstvo;
- mikrokristalna celuloza, Avicel® PH 101 (FMC Biopolymers, USA), kao nerastvorni punilac;
- talk (Merck, Germany), kao klizans;
- magnezijum-stearat (Galenika ad, Serbia), kao lubrikans.

#### **3.2.1.2. Metode**

##### **3.2.1.2.1. Dizajn eksperimenta**

Primenjena je metodologija eksperimentalnog dizajna, uz pomoć softverskog paketa Design Expert® 7.0 (Stat-Ease Inc, Minneapolis, USA). Korišćeni su različiti modeli dizajna (u zavisnosti od postavljenog cilja ispitivanja i raspoloživog broja nezavisno promenljivih), opisani kod pojedinačnih ispitivanja.

### 3.2.1.2.2. Izrada matriks tableta

Tablete su sadržale 380 mg aminofilin hidrata (što odgovara 300 mg anhidrovanog teofilina), 60 mg ili 80 mg ukupne količine polimernog matriksa (Methocel® K100M Premium EP ili Methocel® K4M Premium EP i Carbopol® 971P NF) u zavisnosti od primenjenog plana eksperimenta i postavljenog cilja ispitivanja, 50mg pomoćnih materija (40 % Avicel® PH 101, 30 % Kolidon® K-30 i 30 % mešavine talka i magnezijum-stearata) i bile su pripremljene konvencionalnom metodom nevodene granulacije.

Aktivna supstanca, hidrokisipropilmetilceluloza i mikrokristalna celuloza su mešane i granulisane 10 % alkoholnim rastvorom Kolidon® K-30, kao sredstvom za kvašenje i granulaciju. Proces granulacije je izveden u klasičnom granulatoru-mešalici (Thyssen Henchel tip FM/A10, Germany), a masa aglomerisana na situ 4 mm i sušena u fluidnoj sušnici (Münster, Germany) na 45 °C. Karbomer je dodat u spoljašnju fazu zajedno sa talkom i magnezijum-stearatom. Posle homogenizacije, komprimovanje mase u tablete (490 mg ili 510 mg) je sprovedeno na mašini za tabletiranje (Erweka, Tip EKO) uz korišćenje alata za tabletiranje bikonkavnog oblika prečnika 11mm ili ovalnog oblika 15 mm x 7 mm. Pritisak kompresije iznosio je oko 1.6 MPa, a čvrstina tableta je održavana u opsegu od 150 N do 200 N.

### 3.2.1.2.3. Karakterizacija fizičkih atributa kvaliteta tableta

**Ispitivanje variranja mase tableta** izvršeno je u skladu sa propisom Ph Jug V (na uređaju *Chyo, JL-200*, Japan). Pojedinačno je merena masa 20 tableta i izračunata prosečna vrednost. Rezultati su poređeni sa zahtevom farmakopeje da kod 18 tableta dozvoljeno odstupanje iznosi  $\pm 5\%$  od prosečne mase, a kod dve tablete dozvoljeno odstupanje iznosi  $\pm 10\%$  od prosečne mase.

**Ispitivanje čvrstine tableta** izvršeno je u skladu sa propisom Ph Jug V (na aparatu *Erweka TBH 30*, Germany). Ispitano je 10 tableta i određena srednja vrednost.

**Ispitivanje frijabilnosti tableta** je izvršeno u skladu sa propisom Ph Jug V (na aparatu *Erweka TA 20*, Germany). Ispitivanje je sprovedeno na 20 tableta u frijabilatoru pri brzini obrtaja od 25 obr / min u toku 4 minuta. Iz razlike masa pre i posle procesa frijabilacije izračunat je procenat habanja.



#### **3.2.1.2.4. *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja teofilina iz matriks tableta**

*In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja teofilina iz matriks tableta je izvedeno u aparaturi II USP sa rotirajućom lopaticom (Erweka dissolution taster type DT-80, Germany) na  $37 \pm 2$  °C, pri brzini mešanja od 50 rpm u 900 ml medijuma (pH 1.2 veštački želudačni sok bez pepsina u toku prvog sata ispitivanja i veštački crevni sok bez enzima pH 7.5. od drugog do osmog sata). Sadržaj je ispitivan nakon svakog sata, a koncentracija teofilina određivana je UV-VIS spektrofotometrijskom metodom na 271 nm. Rezultati su izraženi kao procenat deklarisanog sastava u odnosu na anhidrovani teofilin.

#### **3.2.1.2.5. Primena model-zavisnih i model-nezavisnih metoda u analizi profila brzine rastvaranja teofilina iz tableta**

Dobijeni profili oslobađanja su poređeni na osnovu faktora sličnosti (f2) i faktora razlike (f1), okarakterisani u pogledu brzine i mehanizma oslobađanja lekovite supstance primenom modela kinetike nultog reda, Higuchi modela kvadratnog korena i Korsmayer - Peppas-ovog modela (Yuksel i sar., 2000). Izračunati difuzioni eksponent  $n$  je korišćen za predviđanje potencijalnog mehanizma transporta leka, odnosno zastupljenosti procesa difuzije i / ili erozije. Za dobru korelaciju primenjenim modelom, poželjne su bile vrednosti korelacionog koeficijenta bliske 1.0 i vremena odlaganja oslobađanja (*Lag time*) bliskih nuli.

### **3.2.2. Identifikovanje potencijalnog ciljanog profila kvaliteta proizvoda i procena kritičnih atributa kvaliteta gotovog proizvoda, materijala i formulacije**

Kod identifikacije ciljanog profila kvaliteta proizvoda (*Quality Target Product Profile*, QTPP) i potencijalno kritičnih atributa kvaliteta (*Quality attributes*, QA), u okviru koncepta dizajna kvaliteta u toku razvoja proizvoda, korišćeni su od strane FDA preporučeni CTD modeli modula 3.2.P.2. kod razvoja tableta sa trenutnim (FDA, 2012) i modifikovanim (FDA, 2011) oslobađanjem lekovite supstance. Ciljani profil kvaliteta proizvoda QTPP (Yu, 2008; EMEA, 2009; Trivedi, 2012), sastoji se od farmakološkog ciljanog profila proizvoda (*Target Product Profile*, TPP), CDER FDA, 2007, i farmaceutskog profila.

Ciljani profil proizvoda TPP čine farmakološki aspekti kvaliteta (Yu, 2012), indikacije, način primene, farmakokinetički parametri, doza (tabela 3.2.1.), a određen je na osnovu: monografija proizvoda za Phyllocontin 350 mg tablete Purdue Pharma Canada (<http://www.rxmed.co/pharmaceutical>), Phyllotemp® retard 225 mg tablets, Mundipharma, GmbH, Nemačka ([www.epgonline.org/viewdrug.cgm/letter/P/Phyllotemp](http://www.epgonline.org/viewdrug.cgm/letter/P/Phyllotemp)) i Phyllocontin forte 350 mg Napp UK (<http://www.napp.co.uk>).

Farmaceutski profil (tabela 3.2.1.) je definisan na osnovu opštih zahteva monografija za tablete i čvrste oblike sa modifikovanim oslobađanjem, USP oficinalne monografije za teofilin kapsule sa usporenim oslobađanjem i literaturno poznatih tehnoloških zahteva koji trebaju da obezbede postizanje postavljenog farmakološkog profila, a u skladu je sa preporukama Yu, 2012. U trećoj koloni tabele dat je osvrt na značajnost definisanog elementa za kvalitet proizvoda, efikasnost i bezbednost po pacijenta.

Tabela 3.2.1. Ciljani profil proizvoda (TPP) i Ciljani profil kvaliteta proizvoda (QTPP) za aminofilin tablete 350 mg sa modifikovanim oslobađanjem

<i>QTPP elementi</i>		<i>Ciljana vrednost</i>	<i>Pregled kritičnosti</i>
<b>TTP elementi</b>			
Dozirani oblik		tablete sa modifikovanim oslobađanjem	oblik koji obezbeđuje, laku primenu leka i efikasnost bez fluktuacija u oslobađanju
Način primene		oralno	obezbeđuje konformnost primene kod pacijenta,
Doza		350 mg aminofilin hidrata, ekvivalentno 283,5 mg anhidrovanog teofilina,	obezbeđuje efikasnost leka
PK parametri		teofilin se dobro resorbuje iz GIT-a, poluvreme eliminacije $T_{1/2} = 3-9h$ , najmanje 60 % se vezuje za protein plazme, izlučuje se preko urina putem metabolita, oko 10 % leka se eliminiše urinom u nepromenjenom obliku, $T_{max} = 5.3h^{*} **$ , $C_{max} = 4.3\mu g/ml^{*} - 6.8\mu g/ml^{**}$ , $AUC_{0 \rightarrow \infty} = 123.4\mu gh/ml^{*} - 100.64\mu gh/ml^{**}$	
Primena		U terapiji bronhospazma i astme	u skladu sa referentnim preparatom
Alternativni metod primene		nema	preparatom
<b>Elementi farmaceutskog kvaliteta proizvoda</b>			
Atributi kvaliteta gotovog proizvoda QA	Izgled	okrugle tablete, skoro bele sa žigom na jednoj strani	Obezbeđuje saglasnost sa farmaceutskim zahtevima, definisanim opštim farmakopejskim monografijama
	Identifikacija	na teofilin	
	Sadržaj teofilina	95 – 105 %	
	Uniformnost sadržaja	U skladu sa Ph Eur, 2.9.40.	obezbeđuje potrebno rastvaranje leka, terapijsku efikasnost
	Profil brzine rastvaranja	Sličan referentnom leku	
	Stepen čistoće	U skladu sa ICH Q3B i Q6A i USP monografije za teofilin kapsule	
	Mikrobiološka čistoća	U skladu sa važećom monografijom Ph Eur, kategorija 3 A	
Sadržaj vode	max 3 %		
Primarna ambalaža		PVC – Alu blister	obezbeđuje potrebnu efikasnost leka u toku vremena
Stabilnost		na temperature ispod 25 °C, 3 godine	

\* Purdue Pharma Product Monograph,

\*\* - Evropski patent EP 0 284 849 B1

### **3.2.2.1. Rezultati i diskusija**

#### **3.2.2.1.1. Preliminarna procena uticaja, kritičnosti, atributa kvaliteta gotovog proizvoda na osnovu postavljenog ciljanog profila kvaliteta proizvoda**

Na osnovu ciljanog profila kvaliteta proizvoda (QTPP), raspoloživih literaturnih podataka, iskustava u radu na sličnim proizvodima i preliminarno obavljenih ispitivanja, sprovedena je preliminarna procena uticaja, kritičnosti, atributa kvaliteta gotovog proizvoda, shodno preporukama Tima za praćenje kvaliteta u toku životnog ciklusa proizvoda, *Product Quality Lifecycle Implementation Team*, (Garcia i sar., 2008; Nosal i Schultz, 2008).

U svrhe procene kritičnosti primenjen je metod, procene uticaja atributa na "kritičan" ili "ne kritičan" a sproveden je kroz odgovore na postavljena pitanja, pri čemu ukoliko je jedan od odgovora pozitivan, uticaj se procenjuje kao kritičan, što je u skladu sa raspoloživim preporukama vodećih institucija (Garcia i sar., 2008; Nosal i Schultz, 2008).

Utvrđeni inicijalno kritični atributi gotovog proizvoda, na prihvatljivost od strane pacijenta, bezbednost i efikasnost proizvoda i farmaceutski kvalitet prikazani su tabelarno kroz analizu uticaja kritičnosti (tabela 3.2.2.) i sumirano (Tabela 3.2.3.). Dobijeni pregled u saglasnosti je sa literaturnim nalazima i preporukama (Yu, 2008; Yu, 2012; Trivedi, 2012), uključujući i preparate sa modifikovanim oslobađanjem (FDA, 2011).

Rezultati pokazuju, da je veći broj kritičnih atributa gotovog proizvoda potencijalno kritičan za efikasnost i bezbednost kod pacijenta: fizički atribut (oblik/veličina) tablete, sadržaj, uniformnost sadržaja, profil brzine rastvaranja i uključen u dalje analize. Međutim, atributi kvaliteta kao što su identifikacija, stepen čistoće i mikrobiološka čistoća, neće biti dalje razmatrani jer formulacija i procesni parametri nemaju na njih uticaj. Tretiraće se kao kritični atributi kvaliteta (CQA) gotovog proizvoda, prisutni u QTPP, a pratiti kroz uspostavljenu strategiju kontrole (FDA, 2011).

<b>Oblast uticaja</b>	<b>Uslovi</b>	<b>Izgled</b>	<b>Miris</b>	<b>Velicina /oblik tableta</b>	<b>Frjabilnost</b>	<b>Identifikacija</b>	<b>Sadržaj</b>	<b>Uniformnost sadržaja</b>	<b>Stepen čistoće</b>	<b>Profil brzine rastvaranja</b>	<b>Mikrobiološka čistoća</b>	<b>Sadržaj vode</b>
<b>Pacijent</b>	Uticaj na vizuelnu prihvatljivost kod pacijenta?	Ne	Ne	Da	Da	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
	Da li utiče na otežano oralno uzimanje kod pacijenta?	Ne	Ne	Da	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
	Da li ima uslova za žalbu pacijenta u pogledu delovanja leka?	Ne	Ne	Da	Ne	Ne	Da	Ne	Ne	Da	Ne	Ne
<b>Farmakološki efekat</b>	Da li je ugrožena efikasnost?	Ne	Ne	Ne	Ne	Da	Da	Da	Da	Da	Ne	Ne
	Da li je ugrožena bezbednost ?	Ne	Ne	Ne	Ne	Da	Ne	Da	Da	Da	Da	Ne
<b>Farmaceutski kvalitet</b>	Da li je ugrožen farmakopejski zahtev za kvalitet?	Ne	Ne	Ne	Ne	Da	Da	Da	Da	Da	Da	Ne
	<b>Konstatovani uticaj</b>	<i>Ne</i>	<i>Ne</i>	<i>Da</i>	<i>Ne</i>	<i>Da*</i>	<i>Da</i>	<i>Da</i>	<i>Da'</i>	<i>Da</i>	<i>Da*</i>	<i>Ne</i>

\*- atributi kvaliteta gotovog proizvoda sa utvrđenom kritičnošću, koji neće biti dalje razmatrani jer formulacija i procesni parametri nemaju na njih uticaja

Tabela 3.2.3. Sumirani pregled uticaja-kritičnosti utvrđenih potencijalno kritičnih atributa kvaliteta gotovog proizvoda na efikasnost, bezbednost i prihvatljivost od strane pacijenta

Kritični atributi gotovog proizvoda		Ciljana vrednost	Kritičnost	Pregled kritičnosti
Fizički atributi	Izgled	Bez vizuelnih površinskih defekata, boja i oblik prihvatljivi za pacijenta	Ne	Prihvatljiv od strane pacijent, jer je predefinisano standardnog izgleda, standardne boje, poznatog i prihvatljivog od strane pacijenta. Izgled nije direktno u vezi sa bezbednošću i efikasnošću, stoga nije kritičan.
	Miris	Bez mirisa	Ne	Kod ovog proizvoda karakterističan miris nije direktno u vezi sa bezbednošću i efikasnošću proizvoda, već samo može uticati na prihvatljivost od strane pacijenta. Ulazne komponente ovog proizvoda nemaju neprijatan miris.
	Oblik/ Veličina tablete	Slična referentnom proizvodu	Da	Veličina tablete u vezi je sa lakoćom primene od strane pacijenta, a predefinisana je i što sličnijih dimenzija kao referentni. Za oblike sa modifikovanim oslobađanjem oblik, veličina, ukupna površina i volumen mogu uticati na dinamiku oslobađanja aktivne supstance, stoga je kritičan.
	Frijabilnost	Ne više od 1% w/w	Ne	Opšti zahtev kvaliteta tableta, a radi smanjenja postmarketiških reklamacija pacijenata o izgledu
Identifikacija	Pozitivna na teofilin	Da*	Kritična za sigurnost i efikasnost, ali ovaj QA može biti efikasno kontrolisan kroz strategiju in procesne kontrole. Formulacione i procesne promenljive nemaju uticaj na identifikaciju.	
Sadržaj teofilina	95 – 105%	Da	Varijabilnost sadržaja, utiče na efikasnost i bezbednost i stoga je kritičan atribut.	
Uniformnost sadržaja	U skladu sa Ph Eur, 2.9.40.	Da	Uniformnost sadržaja utiče na efikasnost i bezbednost i toga je kritičan atribut.	
Profil brzine rastvaranja	Slična referentnom leku	Da	Profil brzine rastvaranja <i>in vitro</i> je važan za bioraspoloživost (BA) i bioekvivalenciju (BE), te spada u kritične attribute. Pošto je <i>in vitro</i> oslobađanje surogat za <i>in vivo</i> poređenje, potreban je što sličniji profil brzine oslobađanja sa referentnim da bi se obezbedila bioekvivalencija.	
Stepen čistoće	U skladu sa ICH Q3B i Q6A i USP monografije za teofilin kapsule	Da*	Granice za prisutne nečistoće su kritične za bezbednost gotovog proizvoda. Limiti za pojedinačne nepoznate nečistoće trebaju biti u saglasnosti sa ICH Q3B, a limiti za ukupne degradacione se postavljaju na osnovu vrednosti dobijenih na kraju roka trajanja kod referentnog preparata.	
Mikrobiološka čistoća	U skladu sa monografijom USP <467>	Da*	Ukoliko je atribut van zahtevanih granica, postoji direktni uticaj na bezbednost pacijenta. Ukoliko se prati kvalitet ulaznih materijala, čistoća opreme i kvalitet ambijentalnih uslova, formulacija i proces neće uticati na MB kvalitet gotovog proizvoda.	
Sadržaj vode	max 3 %	Ne	Ograničena količina vode u čvrstim doziranim oblicima nema uticaja na efikasnost i bezbednost.	

\*- atributi kvaliteta gotovog proizvoda sa utvrđenom kritičnošću, koji neće biti dalje razmatrani jer formulacija i procesni parametri nemaju na njih uticaja

### **3.2.2.1.2. Inicijalna procena rizika uticaja atributa kvaliteta aktivne supstance na prethodno definisane kritične attribute kvaliteta gotovog proizvoda**

Na osnovu raspoloživih znanja: Ishikawa dijagrama pregleda potencijalnih promenljivih pri proizvodnji tableta, ICH Q8(R2), EMA, 2009, i pregleda potencijalnog odnosa farmaceutskih operacija, parametara procesa i kritičnih atributa kvaliteta tableta predloženog od strane Yu, 2008, (tabela 1.4.), izvršena je inicijalna procena kritičnosti (Hulbert i sar., 2008) uticaja atributa aktivne supstance (tabela 3.2.5. – 3.2.6.) na kritične attribute kvaliteta CQA gotovog proizvoda. Primenjen je FMECA pristup, rangiranjem na osnovu verovatnoće, opasnosti i detektabilnosti.

U Tabeli 3.2.4. prikazani su primenjeni kriterijumi rangiranja i izračunavanja rizika.

Kroz inicijalnu procenu rizika je nađeno da nasipna i sabijna gustina (veličina čestica) aktivne supstance pokazuje srednji nivo rizika i uticaj na fizičke attribute, u slučaju izrade tableta metodom direktne kompresije, što je u saglasnosti sa sugestijama (Jiang, 2009; Koranianiti, 2011). Razlog tome je da aktivna supstanca čini oko 75 % mase za tabletiranje, pa je efekat veličine čestica i gustine materijala na protočnost, kompresibilnost i dobijanje tableta željenih atributa značajan.

Takođe veličina čestica/ gustina kod izrade tableta metodom direktne kompresije može imati uticaj i na sadržaj, uniformnost sadržaja, indirektno i profil brzine rastvaranja gotovog proizvoda, ali se ovi uticaji značajno smanjuju korišćenjem metode vlažne granulacije (tabela 3.2.5.), što je u saglasnosti sa preporukama Koranianti, 2011.

Primenjena su i preliminarna eksperimentalna ispitivanja, koja su ukazala da direktna kompresija nije metoda izbora, zbog slabo protočnih i loše kompresibilnih osobina mase za tabletiranje, te nije ni realna u daljoj proceni, pošto je kao metoda proizvodnje u realnim uslovima neprihvatljiva. Stoga su dalja razmatranja procene rizika sprovedena u kontekstu predefinisane metode vlažne granulacije kojom se prevazilazi uticaj gustine i protočnosti i dobijaju tablete predefinisane oblika i veličine.

Tabela 3.2.4. Primenjeni kriterijumi rangiranja i izračunavanja rizika

<b>Uticaoj (Impact – I)</b>	<b>Opis kriterijuma procene i prihvatljivosti rizika</b>	<b>Rangiranje</b>
<b>Da</b>	Postoji uticaoj na kvalitet proizvoda i/ili bezbednost i efikasnost za pacijenta. Uticaoj nije prihvatljiv/pod kontrolom	1
<b>Ne</b>	Nema uticaja na kvalitet proizvoda i/ili bezbednost i efikasnost za pacijenta	0
<b>Opasnost/ (Severity - S)</b>	<b>Opis kriterijuma procene i prihvatljivosti rizika</b>	<b>Rangiranje</b>
<b>H</b>	Ozbiljno ugrozavanje zdravlja pacijenata.	3
<b>M</b>	Pojava retkih neželjenih reakcija kod pacijenata.	2
<b>L</b>	Ne može dovesti do oštećenja zdravlja pacijenata, već smanjenja / izostajanja farmakološkog dejstva leka	1
<b>Verovatnoća pojavljivanja/ (Probability of Occurance - O)</b>	<b>Opis kriterijuma procene i prihvatljivosti rizika</b>	<b>Rangiranje</b>
<b>H</b>	Moguća/česta u postavljenim uslovima	6
<b>M</b>	Potencijalno moguća	3
<b>L</b>	Vrlo retka	1
<b>Detektabilnost/ (Detectability- D)</b>	<b>Opis kriterijuma procene i prihvatljivosti rizika</b>	<b>Rangiranje</b>
<b>H</b>	Oštećenje neće biti detektovano brzo, posle nastanka niti u toku QC testiranja	3
<b>M</b>	Oštećenje će biti detektovano ali kasnije, posle nekih periodičnih pregleda	2
<b>L</b>	Oštećenje može biti detektovano vrlo brzo, odmah posle nastanka ili u toku QC testiranja	1
<b>Nivo Rizika</b>	<b>Kriterijum rangiranja ukupnog rizika</b>	<b>Rangiranje</b>
<b>H</b>	Rizik nije prihvatljiv, dalja ispitivanja se zahtevaju	$X \geq 18$
<b>M</b>	Rizik je prihvatljiv, ali se mora postaviti odgovarajuća strategija kontrole ili daljim ispitivanjima raditi na smanjenju rizika	$6 < X < 18$
<b>L</b>	Rizik je prihvatljiv i pod kontrolom; dalja ispitivanja nisu potrebna	$0 < X \leq 6$
<b>Bez rizika</b>	Dalja ispitivanja nisu potrebna	$X = 0$

*L- mali; M-srednji; H-visoki nivo rizika aktivne supstance*

Ukupan rizik se izračunava kao proizvod pojedinačnih rizika, prema jednačini:

$$\text{Ukupan rizik} = I \times S \times O \times D \quad (12)$$



Tabela 3.2.5. Lista procene inicijalnog rizika atributa kvaliteta aktivne supstance na kritične attribute kvaliteta gotovog proizvoda

Razmatrani atribut	Risk scenario / opis	Uticaj	Potencijalni efekat	Opasnost	Uzrok pojavljivanja	Pojavljivanje	Kontrola procesa / proizvoda	Mogućnosti detekcije	Ukupan Rizik
<b>Fizički oblik API</b>	Ne mogu se dobiti tablete željenog oblika/veličine.	Ne/ 0	Neadekvatan fizički kvalitet tableta	L/1	Neadekvatna gustina materijala	L/1	Konstatuje se u toku samog procesa tabletiranja	L/1	Bez rizika (0)
	Snižen sadržaj lekovite supstance u tabletama.	Ne/ 0	Van farmakopejskih / regulatornih zahteva	L/1	Nehomogenost mase za tabletiranje/	M/3	Konstatuje se u toku kontrole QC	L/1	Bez rizika (0)
	Velika varijabilnost sadržaja u tabletama, neuniformnost.	Ne/ 0	Van farmakopejskih / regulatornih zahteva	H/3	Nehomogenost mase za tabletiranje/	M/3	Konstatuje se u toku kontrole QC	L/1	Bez rizika (0)
	Neodgovarajući profil rastvaranja kod modifikovanog oslobađanja leka	Ne/ 0	Van farmakopejskih / regulatornih zahteva / promenjena efikasnost	H/3	Nehomogeno prisustvo matriks formirajućeg polimera	L/1	Konstatuje se u toku kontrole QC	L/1	Bez rizika (0)
<b>Veličina čestica / nasipna i sabijna gustina</b>	Ne mogu se dobiti tablete željenog oblika/veličine metodom direktne kompresije.	Da/1	Neadekvatan fizički kvalitet tableta	L/1	Neadekvatna protočnost i gustine materijala za tabletiranje	H/6	Konstatuje se u toku samog procesa tabletiranja	L/1	M (6)
	Ne mogu se dobiti tablete željenog oblika/veličine metodom vlažne granulacije.	Ne/ 0	Neadekvatan fizički kvalitet tableta	L/1	Neadekvatna protočnost i gustina granulata	M/3	Konstatuje se u toku samog procesa tabletiranja	L/1	Bez rizika (0)
	Snižen sadržaj lekovite supstance u tabletama izrađenim direktnom kompresijom.	Da/1	Van farmakopejskih / regulatornih zahteva	L/1	Nehomogena raspodela lekovite supstance u masi za tabletiranje	M/3	Konstatuje se u toku kontrole QC	L/1	M (3)
	Snižen sadržaj lekovite supstance u tabletama izrađenim vlažnom granulacijom.	Ne/ 0	Neadekvatan fizički kvalitet tableta	L/1	Neadekvatna protočnost i gustina granulata	L/1	Konstatuje se u toku kontrole QC	L/1	Bez rizika (0)
	Velika varijabilnost sadržaja neuniformnost u tabletama izrađenim direktnom kompresijom.	Da/1	Van farmakopejskih / regulatornih zahteva	H/3	Nehomogena raspodela lekovite supstance u masi za tabletiranje	M/3	Konstatuje se u toku kontrole QC	L/1	M (9)

*L- mali; M-srednji; H-visoki nivo rizika aktivne supstance*

Tabela 3.2.5. (nastavak) Lista procene inicijalnog rizika atributa kvaliteta aktivne supstance na kritične attribute kvaliteta gotovog proizvoda

Razmatrani atribut	Risk scenario / opis	Uticaj	Potencijalni efekat	Opasnost	Uzrok pojavljivanja	Pojavljivanje	Kontrola procesa / proizvoda	Mogućnosti detekcije	Ukupan Rizik
Veličina čestica/nasipna i sabijna gustina	Velika varijabilnost sadržaja neuniformnost u tabletama izrađenim vlažnom granulacijom.	Ne/0	Van farmakopejskih / regulatornih zahteva	H/3	Nehomogena raspodela lekovite supstance u granulatu	L/1	Konstatuje se u toku kontrole QC	L/1	Bez rizika (0)
	Neodgovarajući profil rastvaranja kod modifikovanog oslobađanja leka, tableta izrađenih direktnom kompr.	Da/1	Van farmakopejskih / regulatornih zahteva / promenjena efikasnost	H/3	Nehomogeno prisustvo matriks formirajućeg polimera	M/3	Konstatuje se u toku kontrole QC	L/1	M (9)
	Neodgovarajući profil rastvaranja kod modifikovanog oslobađanja leka, tableta izrađenih vlažnom granulac.	Ne/0	Van farmakopejskih / regulatornih zahteva / promenjena efikasnost	H/3	Nehomogeno prisustvo matriks formirajućeg polimera	L/1	Konstatuje se u toku kontrole QC	L/1	Bez rizika (0)
Higroskopnost	Ne mogu se dobiti tablete željenog oblika/veličine.	Ne/0	Neadekvatan fizički kvalitet tableta	L/1	Visoka vlaga u tableti	L/1	Konstatuje se u toku samog procesa tabletiranja	L/1	Bez rizika (0)
	Snižen sadržaj lekovite supstance u tabletama.	Ne/0	Van farmakopejskih / regulatornih zahteva	L/1	Kod higroskopnih sup zbog degradacije aktivne supstance pod uticajem vlage	M/3	Konstatuje se posle periodičnih pregleda ili u toku studije stabilnosti	M/2	Bez rizika (0)
	Velika varijabilnost sadržaja u tabletama, neuniformnost.	Ne/0	Van farmakopejskih / regulatornih zahteva	H/3	Usled degradacije aktivne supstance pod uticajem absorbovane vlage	M/3	Konstatuje se posle periodičnih pregleda ili u toku studije stabilnosti	M/2	Bez rizika (0)
	Neodgovarajući profil rastvaranja u okviru modifikacije oslobađanja leka	Ne/0	Van farmakopejskih / regulatornih zahteva / promenjena efikasnost	H/3	Usled degradacije aktivne supstance pod uticajem absorbovane vlage	M/3	Konstatuje se posle periodičnih pregleda ili u toku studije stabilnosti	M/2	Bez rizika (0)

*L- mali; M-srednji; H-visoki nivo rizika aktivne supstance*

Tabela 3.2.5. (nastavak) Lista procene inicijalnog rizika atributa kvaliteta aktivne supstance na kritične attribute kvaliteta gotovog proizvoda

Razmatrani atribut	Risk scenario / opis	Uticao	Potencijalni efekat	Opasnost	Uzrok pojavljivanja	Pojavljivanje	Kontrola procesa / proizvoda	Mogućnosti detekcije	Ukupan Rizik
<b>Rastvorljivost</b>	Ne mogu se dobiti tablete željenog oblika/veličine.	Ne/0	Neadekvatan fizički kvalitet tableta	L/1	Neadekvatna gustina materijala	L/1	Konstatuje se u toku samog procesa tabletiranja	L/1	Bez rizika (0)
	Snižen sadržaj lekovite supstance u tabletama.	Ne/0	Van farmakopejskih / regulatornih zahteva	L/1	Nehomogenost mase za tabletiranje/	M/3	Konstatuje se u toku kontrole QC	L/1	Bez rizika (0)
	Velika varijabilnost sadržaja u tabletama, neuniformnost.	Ne/0	Van farmakopejskih / regulatornih zahteva	H/3	Nehomogenost mase za tabletiranje/	M/3	Konstatuje se u toku kontrole QC	L/1	Bez rizika (0)
	Neodgovarajući profil rastvaranja u okviru modifikacije oslobađanja leka	Ne/0	Van farmakopejskih / regulatornih zahteva / promenjena efikasnost	H/3	Usled smanjene rastvorljivosti leka	M/3	Konstatuje se u toku kontrole QC	L/1	Bez rizika (0)
<b>Stepen čistoće</b>	Ne mogu se dobiti tablete željenog oblika/veličine.	Ne/0	Neadekvatan fizički kvalitet tableta	L/1	Neadekvatna gustina materijala	L/1	Konstatuje se u toku samog procesa tabletiranja	L/1	Bez rizika (0)
	Snižen sadržaj lekovite supstance u tabletama.	Ne/0	Van farmakopejskih / regulatornih zahteva	L/1	Nehomogenost mase za tabletiranje/	M/3	Konstatuje se u toku kontrole QC	L/1	Bez rizika (0)
	Velika varijabilnost sadržaja u tabletama, neuniformnost.	Ne/0	Van farmakopejskih / regulatornih zahteva	H/3	Nehomogenost mase za tabletiranje/	M/3	Konstatuje se u toku kontrole QC	L/1	Bez rizika (0)
	Neodgovarajući profil rastvaranja u okviru modifikacije oslobađanja leka	Ne/0	Van farmakopejskih / regulatornih zahteva / promenjena efikasnost	H/3	Usled smanjene rastvorljivosti leka	M/3	Konstatuje se u toku kontrole QC	L/1	Bez rizika (0)

*L- mali; M-srednji; H-visoki nivo rizika aktivne supstance*

Tabela 3.2.6. Pregled inicijalne procene rizika, kritičnih atributa lekovite supstance na kritične attribute kvaliteta gotovog proizvoda

<i>Atributi lekovite supstance</i>	<i>CQA gotovog proizvoda</i>	<i>Procenjen nivo rizika</i>	<i>Pregled kritičnosti</i>
<b>Fizički oblik API</b>	<b>Fizički atributi / oblik, veličina tablete</b>	Bez-rizika	Aminofilin ne pokazuje polimorfne forme, te je isključeno pojavljivanje različitih fizičkih oblika aktivne supstance, tako da nema uticaja na fizičke attribute, sadržaj i uniformnost sadržaja
	<b>Sadržaj</b>	Bez-rizika	
	<b>Uniformnost sadržaja</b>	Bez-rizika	
	<b>Profil brzine rastvaranja</b>	Bez-rizika	Pošto se ne javlja u različitim fizičkim formama isključena je mogućnost prelaska u drugu formu različite rastvorljivosti, takođe kao BCS lek grupe I, dobro rastvoran nema uticaj na profil oslobađanja, u slučaju modifikovanog oslobađanja.
<b>Veličina čestica / nasipna i sabijna gustina</b>	<b>Fizički atributi / oblik, veličina</b>	M	Pošto aktivna supstanca čini oko 75 % mase za tabletiranje, uticaj veličine čestica i gustine materijala na protočnost i kompresibilnost i dobijanje tableta željenih karakteristika je srednjeg nivoa rizika, pri izradi tableta metodom direktne kompresije. Primenom metode vlažne granulacije, se poboljšavaju gustina i protočnost, smanjuje se nivo rizika i dobijaju tableta predefinisane oblika i veličine.
	<b>Sadržaj</b>	M	Zbog loše protočnih svojstava kod metode direktne kompresije, uprkos visokom udelu aktivne supstance u mešavini za tabletiranje moguć je uticaj na sadržaj i uniformnost sadržaja. Metodom vlažne granulacije uticaj se smanjuje.
	<b>Uniformnost sadržaja</b>		
<b>Profil brzine rastvaranja</b>	M	Kod tableta izrađenih direktnom kompresijom uticaj je moguć. Metodom vlažne granulacije i za dobro uspostavljen process proizvodnje rizik se smanjuje, što pokazuju i literaturni podaci: kod lako rastvornog aminofilina veličina čestica nema uticaj na brzinu rastvaranja u slučaju hidrofilnih matriksa sa modifikovanim oslobađanjem (Ford i sar,1985).	
<b>Higroskopnost</b>	<b>Fizički atributi / oblik, veličina</b>	Bez-rizika	Aktivna supstanca nije higroskopna, rizik da absorbovana voda utiče na fizičke karakteristike tableta, sadržaj, uniformnost i profil oslobađanja nije prisutan.
	<b>Sadržaj</b>		
	<b>Uniformnost sadržaja</b>		
	<b>Profil brzine rastvaranja</b>		
<b>Rastvorljivost</b>	<b>Fizički atributi / oblik, veličina</b>	Bez-rizika	Rastvorljivost lekovite supstance BCS I grupe nema uticaj na fizičke karakteristike tableta, sadržaj i uniformnost sadržaja I rizik nije prisutan.
	<b>Sadržaj</b>		
	<b>Uniformnost sadržaja</b>		
	<b>Profil brzine rastvaranja</b>	Bez-rizika	Generalno rastvorljivost utiče na profil brzine rastvaranja. Kod analiziranog preparata profil modifikovanog oslobađanja zavisi od nagrađenog matriks sistema.
<b>Stepen čistoće</b>	<b>Fizički atributi / oblik, veličina</b>	Bez-rizika	Nečistoće kod aktivne supstance predefinisane su od strane proizvođača. Rizik da ove nečistoće utiču na sve navedene kritične attribute kvaliteta gotovog proizvoda nije prisutan.
	<b>Sadržaj</b>		
	<b>Uniformnost sadržaja</b>		
	<b>Profil brzine rastvaranja</b>		

*L- mali; M-srednji; H-visoki nivo rizika aktivne supstance*

Rezultati su pokazali da atributi kvaliteta aktivne supstance, koja pripada I grupi Biofarmaceutskog sistema klasifikacije, nemaju visok nivo kritičnosti, na attribute kvaliteta u slučaju gotovog proizvoda sa modifikovanim oslobađanjem.

Što je u skladu i sa literaturnim navodima, da je za navedenu grupu brzina rastvaranja aktivne supstance uslovljena prvenstveno formulacijom, što se u velikom broju slučajeva može postići odgovarajućim tehnološkim rešenjem (Emami, 2006; Nainar i sar., 2012; Cardot i sar., 2012). U skladu sa tim, takođe nađeni srednji nivo rizika (za veličinu čestica aktivne supstance na fizičke attribute tableta, sadržaj, uniformnost sadržaja i profil brzine rastvaranja) se može umanjiti primenom određenog tehnološkog rešenja kao što je u ovom slučaju vlažna granulacija. Na osnovu sprovedene analize konstatovano je da bi formulacione komponente koje ulaze u sastav tablete trebalo analizirati u pogledu kritičnosti i uticaja na kritične attribute kvaliteta gotovog proizvoda.

Uticaj kritičnih atributa kvaliteta polimera, kao što su variranje viskoziteta među različitim serijama hidroksipropilmetilceluloze, udeo hidroksipropil grupe i veličine čestica na fizičke attribute tableta i profil brzine rastvaranja, su razmatrani od strane Deng i sar., 2011 i Robertson i sar., 2012, na bazi *QbD* pristupa uz konstataciju da nemaju uticaja, a na primeru teofilin tableta sa modifikovanim oslobađanjem. Stoga navedeni atributi u kontekstu uticaja izdvojenog materijala na kritične attribute kvaliteta gotovog proizvoda nisu razmatrani, imajući u vidu literaturne nalaze.

#### **3.2.2.1.3. Inicijalna procena rizika uticaja formulacionih komponenata i formulacionih promenljivih na kritične attribute kvaliteta gotovog proizvoda**

Pošto je vlažna granulacija definisana kao jedina prihvatljiva, predviđena je izrada matriks granulata sa modifikovanim oslobađanjem aktivne supstance uz dodatak intragranularnog matriks formirajućeg polimera (hidroksipropilmetilceluloze), nerastvornog punioca (mikrokristalne celuloze) i vezivnog sredstva (polivinilpirolidon K-30), dok bi se ekstragranularno dodavali ekscipijensi sa funkcijom lubrikansa (magnezijum-stearat) i sredstva za klizanje (talk). U slučaju kombinacije matriks polimera drugi polimer (karbomer) bi se dodavao ekstragranularno.

Matriks granulat sa modifikovanim oslobađanjem leka, ekstragranularni ekscipijensi i ekstragranularni polimer će se tretirati kao formulacione komponente kod inicijalne procene rizika formulacionih komponenata na *CQA* gotovog proizvoda (tabela 3.2.7.-3.2.8.), što je u skladu sa preporukama Jiang, 2009, da se vrsta ekscipijensa i njihov udeo trebaju tretirati kao kritični atributi ulaznih materijala.

Isti kriterijumi rangiranja i izračunavanja rizika, kao i u prethodnoj analizi, a prikazani u tabeli 3.2.4., su korišćeni.

Na osnovu sprovedene inicijalne procene rizika uticaja formulacionih komponenata na kritične attribute kvaliteta gotovog proizvoda, proizilazi da granulat sa modifikovanim oslobađanjem pokazuje srednji nivo rizika na fizičke karakteristike tableta, a zajedno sa ekstragranularnim polimerom visok nivo rizika na profil oslobađanja gotovog proizvoda, dok je uticaj na sadržaj i uniformnost sadržaja niskog nivoa rizika (tabela 3.2.8.), što je u saglasnosti sa literaturnim navodima o uticaju faktora na oslobađanje leka iz hidroksipropilmetilceluloznog matriksa (Ford i sar., 1985a, Ford i sar., 1987; Dow Chemical, 2009), odnosno karbomer matriksa (Li i sar., 2003; Lubrizol, 2011b).

Tabela 3.2.7. Lista procene inicijalnog rizika formulacionih komponenata na kritične atribute kvaliteta gotovog proizvoda

Razmatrani atribut	Risk scenario / opis	Uticaj	Potencijalni efekat	Opasnost	Uzrok pojavljivanja	Pojavljanje	Kontrola procesa / proizvoda	Mogućnost detekcije	Ukupni Rizik
<b>Granulat sa modifikovanim oslobađanjem leka</b>	Ne mogu se dobiti tablete željenog oblika/veličine.	Da/ 1	Fizički kvalitet tableta van postavljenih zahteva	L/1	Neprihvatljiva kompresibilna i protočna svojstva i sabijna gustina mase za tabletiranje / granulata	H/6	Konstatuje se u toku samog procesa tabletiranja	L/1	M (6)
	Snižen sadržaj lekovite supstance u tabletama.	Da/ 1	Van farmakopejskih / regulatornih zahteva	L/1	Nehomogenost granulata / mase za tabletiranje	M/3	Konstatuje se u toku kontrole QC	L/1	L (3)
	Velika varijabilnost sadržaja u tabletama, neuniformnost.	Da/ 1	Van farmakopejskih / regulatornih zahteva	H/3	Nehomogenost granulata / mase za tabletiranje	L/1	Konstatuje se u toku kontrole QC	L/1	L (3)
	Neodgovarajući profil rastvaranja kod modifikovanog oslobađanja leka	Da/ 1	Van farmakopejskih / regulatornih zahteva / promenjena efikasnost	H/3	Prisutan matriks formirajući polimer u granulatu (količina i tip)	H/6	Konstatuje se u toku kontrole QC	L/1	H (18)
<b>Ekstragranularni ekscipijensi (lubrikansi i klizansi)</b>	Ne mogu se dobiti tablete željenog oblika/veličine.	Da/1	Fizički kvalitet tableta van postavljenih zahteva	L/1	Loše protočna i klizajuća svojstva mase za tabletiranje	M/3	Konstatuje se u toku samog procesa tabletiranja	L/1	L (3)
	Snižen sadržaj lekovite supstance u tabletama.	Da/1	Van farmakopejskih / regulatornih zahteva	L/1	Površinsko oblaganje čestica lekovite supstance česticama lubrikansa	L/1	Konstatuje se u toku kontrole QC	L/1	L (1)
	Velika varijabilnost sadržaja u tabletama, neuniformnost.	Da/1	Van farmakopejskih / regulatornih zahteva	H/3	Nehomogena raspodela lekovite supstance	L/1	Konstatuje se u toku kontrole QC	L/1	L (3)
	Neodgovarajući profil rastvaranja kod modifikovanog oslobađanja leka	Da/1	Van farmakopejskih / regulatornih zahteva / promenjena efikasnost	H/3	Uticaj lubrikansa na promenu dinamike rastvaranja leka iz formiranog matriksa	L/1	Konstatuje se u toku kontrole QC	L/1	L (3)
<b>Ekstragranularni polimer</b>	Ne mogu se dobiti tablete željenog oblika/veličine.	Ne/0	Fizički kvalitet tableta van postavljenih zahteva	L/1	Neprihvatljiva protočna svojstva mase za tabletiranje	L/1	Konstatuje se u toku samog procesa tabletiranja	L/1	Bez rizika (0)
	Snižen sadržaj lekovite supstance u tabletama.	Ne/0	Van farmakopejskih / regulatornih zahteva	L/1	Nehomogena raspodela lekovite supstance	L/1	Konstatuje se u toku kontrole QC	L/1	Bez rizika (0)
	Velika varijabilnost sadržaja u tabletama, neuniformnost.	Ne/0	Van farmakopejskih / regulatornih zahteva	H/3	Nehomogena raspodela lekovite supstance	L/1	Konstatuje se u toku kontrole QC	L/1	Bez rizika (0)
	Neodgovarajući profil rastvaranja u okviru modifikacije oslobađanja leka	Da/1	Van farmakopejskih / regulatornih zahteva /promenjena efikasnost	H/3	Raspodela matriks formirajućeg polimera ekstragranularno (količina i tip)	H/6	Konstatuje se u toku kontrole QC	L/1	H (18)

*L- mali; M-srednji; H-visoki nivo rizika aktivne supstance*

Tabela 3.2.8. Pregled inicijalne procene rizika, kritičnih formulacionih komponenata na kritične atribute kvaliteta gotovog proizvoda

<i>Formulacione komponente</i>	<i>CQA gotovog proizvoda</i>	<i>Procenjen nivo rizika</i>	<i>Pregled kritičnosti</i>
<b>Granulat sa modifikovanim oslobađanjem leka</b>	<b>Fizički atributi / oblik, veličina tablete</b>	M	Obzirom da je količina granulata u mešavini za tabletiranje visoka, oko 93 %, protočnost, nasipna i sabijna gustina granulata ima direktan uticaj na oblik i veličinu dobijene tablete i uticaj na fizičke atribute tableta je srednjeg nivoa rizika.
	<b>Sadržaj</b>	L	Obzirom na visok procenat aktivne supstance u granulatu, varijabilnost sadržaja je malog uticaja.
	<b>Uniformnost sadržaja</b>	L	Granule sadrže više od 80 % aktivne supstance i uz metodu vlažne granulacije i homogenizacije vlažne mase, mala je verovatnoća pojave nehomogenosti granulata. Tako da je rizik uticaja granulata na uniformnost u tabletama nizak.
	<b>Profil brzine rastvaranja</b>	H	Pošto je granulat izrađen kao mešavina matriks formirajućeg polimera i aktivne supstance, prisutan je direktan uticaj prisutnog polimera na profil oslobađanja sa visokim nivoom rizika
<b>Ekstragranularni ekscipijensi (lubrikansi i klizansi)</b>	<b>Fizički atributi / oblik, veličina</b>	L	Količina ekstragranularnih ekscipijenasa korišćenih u formulaciji tableta je niska, do 3 % i predstavljaju kombinaciju lubrikansa i sredstva za klizanje u predefinisanoj odnosu 1:2. Uticaj magnezijum stearate i talka za predefinisani odnos i količinu u tableti, na fizičke atribute tableta je malog nivoa rizika.
	<b>Sadržaj</b>	L	Zbog niske koncentracije ekstragranularnih ekscipijenasa tipa lubrikansa i glidansa, a takođe i njihovog uticaja na poboljšanje protočnih svojstava mase za tabletiranje, njihov uticaj na sadržaj i uniformnost sadržaja je nizak.
	<b>Uniformnost sadržaja</b>		
<b>Profil brzine rastvaranja</b>	L	Literatura navodi uticaj magnezijum stearata na promenu brzine rastvaranja leka, međutim u slučaju hidrofilnih matriksa sa modifikovanim oslobađanjem na bazi aminofilina utvrđeno je da magnezijum stearat ne utiče na usporavanje oslobađanja (Ford i sar, 1985b), stoga je njegov uticaj niskog nivoa rizika.	
<b>Ekstragranularni polimer</b>	<b>Fizički atributi / oblik, veličina</b>	Bez-rizika	Prisutan u niskoj količini do 4 %, dobro protočan te ne utiče na protočna i kompresibilna svojstva mase, odnosno uticaj polimera na oblik i veličinu tablete nije prisutan. Bez uticaja i na sadržaj i uniformnost sadržaja
	<b>Sadržaj</b>		
	<b>Uniformnost sadržaja</b>		
	<b>Profil brzine rastvaranja</b>	H	Količina i tip drugog polimera u formulaciji ima značajan uticaj na promene u profilu oslobađanja leka. Stoga je ekstragranularni polimer sa visokim nivoom rizika na profil brzine rastvaranja.

*L- mali; M-srednji; H-visoki nivo rizika aktivne supstance*

Obzirom na pretpostavljeni uticaj granulata sa modifikovanim oslobađanjem na profil brzine rastvaranja aktivne supstance kod gotovog proizvoda, inicijalna procena rizika je u sledećem koraku sprovedena za formulacione promenljive u okviru granulata.

Kao formulacione promenljive su izdvojene: intragranularni matriks formirajući polimer, njegov udeo u ukupnom polimernom matriksu, prisustvo vezivnog sredstva, prisustvo punioca, mikrokristalne celuloze MCC, na kritične atribute kvaliteta gotovog proizvoda (fizičke atribute tablete i profil brzine rastvaranja). Tabelarno je prikazana lista procene uticaja (tabela 3.2.9.) i pregled dobijenog inicijalnog rizika (tabela 3.2.10.) za formulacione promenljive.



Tabela 3.2.9. Lista procene inicijalnog rizika formulacionih promenljivih na kritične attribute kvaliteta gotovog proizvoda

Razmatrani atribut	Risk scenario / opis	Utijad	Potencijalni efekat	Opasnost	Uzrok pojavljivanja	Pojavljivanje	Kontrola procesa	Mogućnosti detekcije	Ukupan Rizik
<b>Intragranularni matriks formirajući polimer</b>	Ne mogu se dobiti tablete željenog oblika/veličine.	Da/ 1	Fizički kvalitet tableta van postavljenih zahteva	L/1	Neprihvatljiva kompresibilna i protočna svojstva i sabijna gustina granulata	H/6	Konstatuje se u toku samog procesa tabletiranja	L/1	M (6)
	Neodgovarajući profil rastvaranja kod modifikovanog oslobađanja leka	Da/ 1	Van farmakopejskih / regulatornih zahteva / promenjena efikasnost	H/3	Tip i udeo matriks formirajućeg polimera	H/6	Konstatuje se u toku kontrole QC	L/1	H (18)
<b>Udeo intragranularnog polimera u ukupnom polimernom matriksu</b>	Ne mogu se dobiti tablete željenog oblika/veličine.	Da/1	Fizički kvalitet tableta van postavljenih zahteva	L/1	Neprihvatljiva kompresibilna i protočna svojstva i sabijna gustina granulata	H/6	Konstatuje se u toku samog procesa tabletiranja	L/1	M (6)
	Neodgovarajući profil rastvaranja kod modifikovanog oslobađanja leka	Da/1	Van farmakopejskih / regulatornih zahteva / promenjena efikasnost	H/3	Neadekvatan odnos lek / polimer u granulatu	H/6	Konstatuje se u toku kontrole QC	L/1	H (18)
<b>Prisustvo vezivnog sredstva</b>	Ne mogu se dobiti tablete željenog oblika/veličine.	Da/1	Fizički kvalitet tableta van postavljenih zahteva	L/1	Neprihvatljiva sabijna gustina mase za tabletiranje	H/6	Konstatuje se u toku samog procesa tabletiranja	L/1	M (6)
	Neodgovarajući profil rastvaranja u okviru modifikacije oslobađanja leka	Ne/0	Van farmakopejskih /regulatornih zahteva /promenjena efikasnost	H/3	Tip i udeo matriks formirajućeg polimera	L/1	Konstatuje se u toku kontrole QC	L/1	Bez rizika (0)
<b>Prisustvo punioca (MCC)</b>	Ne mogu se dobiti tablete željenog oblika/veličine.	Da/1	Fizički kvalitet tableta van postavljenih zahteva	L/1	Neprihvatljiva sabijna gustina mase za tabletiranje	H/6	Konstatuje se u toku samog procesa tabletiranja	L/1	M (6)
	Neodgovarajući profil rastvaranja u okviru modifikacije oslobađanja leka	Ne/0	Van farmakopejskih /regulatornih zahteva /promenjena efikasnost	H/3	Tip i udeo matriks formirajućeg polimera	L/1	Konstatuje se u toku kontrole QC	L/1	L (3)

L- mali; M-srednji; H-visoki nivo rizika aktivne supstance

Tabela 3.2.10. Pregled inicijalne procene rizika, kritičnih formulacionih promenljivih na kritične atribute kvaliteta gotovog proizvoda

<i>Formulacione promenljive</i>	<i>CQA gotovog proizvoda</i>	<i>Procenjen nivo rizika</i>	<i>Pregled kritičnosti</i>
<b>Intragranularni matriks formirajući polimer</b>	<b>Fizički atributi / oblik, veličina tablete</b>	M	Prisutni matriks formirajući polimer, zbog viskoznih svojstava, pored osnovne funkcije formiranja matriksa, pokazuje i dodatnu ulogu sredstva za vezivanje pa sinergistički sa PVP K30, doprinosi poboljšanju protočnosti, sabijne gustine granulata, a time omogućava postizanje predefinisnog oblika i veličine tablete. Nivo rizika je srednji.
	<b>Profil brzine rastvaranja</b>	H	Prisutni matriks formirajući polimer ima direktan uticaj na profil brzine rastvaranja aktivne supstance, sa visokim nivoom rizika
<b>Udeo intragranularnog polimera u ukupnom polimernom matriksu</b>	<b>Fizički atributi / oblik, veličina tablete</b>	M	Dodatna uloga matriks formirajućeg polimera kao vezivnog sredstva, pokazuje srednji nivo uticaja na kvalitet dobijene tablete.
	<b>Profil brzine rastvaranja</b>	H	Udeo polimera i odnos lek/polimer u formulaciji imaju direktan uticaj na profil brzine rastvaranja, što je potvrđeno i mnogobrojnim literaturnim rezultatima. Stoga je nivo rizika visok.
<b>Prisustvo vezivnog sredstva</b>	<b>Fizički atributi / oblik, veličina tablete</b>	M	Količina vezivnog sredstva korišćena pri formulisanju granulata služi da poboljša povezivanje i aglomeraciju prahova, obezbedi bolja protočna i kompresibilna svojstava. Ima srednji nivo rizika na fizičke atribute tableta.
	<b>Profil brzine rastvaranja</b>	Bez-rizika	Nosilac uticaja na oslobađanje leka su matriks formirajući polimeri. Prisutno vezivno sredstvo je bez rizika na profil brzine rastvaranja.
<b>Prisustvo punioca (MCC)</b>	<b>Fizički atributi / oblik, veličina tablete</b>	M	Kao punilac sa dobro protočnim svojstvima doprinosi poboljšanju protočnih i kompresibilnih svojstava mase, te pokazuje srednji nivo rizika na fizičke atribute tableta.
	<b>Profil brzine rastvaranja</b>	L	Literaturna razmatranja pokazuju da MCC nema uticaja na brzinu rastvaranja lako rastvornih lekovitih supstanci iz hidrofiličnih matriksa, na primeru aminofilin tableta sa HPMC (Ford i sar., 1987).

*L- mali; M-srednji; H-visoki nivo rizika aktivne supstance*

Visok nivo rizika i uticaj na profil brzine rastvaranja pokazuju: intragranularni matriks formirajući polimer, njegov udeo u ukupnom polimernom matriksu; srednji nivo rizika na fizičke atribute (oblik, veličina) tableta pokazuju sve formulacione promenljive: intragranularni matriks formirajući polimer, njegov udeo u ukupnom polimernom matriksu, udeo vezivnog sredstva i punioca.

Na osnovu svih sprovedenih analiza uticaja i inicijalnih procena rizika, utvrđeno je:

- potencijalno kritičnim za efikasnost i bezbednost kod pacijenta mogu se smatrati sledeći kritični atributi kvaliteta gotovog proizvoda: fizički atributi (oblik/veličina) tablete, sadržaj, uniformnost sadržaja, profil brzine rastvaranja. Atributi kvaliteta kao

što su identifikacija, stepen čistoće i mikrobiološka čistoća takođe spadaju u kritične attribute kvaliteta gotovog proizvoda, ali se dalje ne razmatraju pošto formulacija i procesni parametri nemaju na njih uticaj.

- atributi kvaliteta aktivne supstance, koja pripada I grupi biofarmaceutskog sistema klasifikacije i uz primenu metode vlažne granulacije, ne pokazuju visok nivo rizika, na attribute kvaliteta kod gotovog proizvoda sa modifikovanim oslobađanjem,
- formulaciona komponenta kao što je granulat sa modifikovanim oslobađanjem pokazuje srednji nivo rizika na fizičke attribute kvaliteta tableta, a zajedno sa ekstragranularnim polimerom visok nivo rizika na profil brzine oslobađanja lekovite supstance, dok je uticaj na sadržaj i uniformnost sadržaja niskog nivoa rizika,
- formulacione promenljive u okviru granulata sa modifikovanim oslobađanjem, intragranularni matriks formirajući polimer i njegov udeo u ukupnom polimernom matriksu pokazuju visok nivo rizika na profil brzine rastvaranja leka kao kritični atribut kvaliteta gotovog proizvoda. Srednji nivo rizika na kritične fizičke attribute (oblik, veličina) tableta imaju sve formulacione promenljive: intragranularni matriks formirajući polimer, njegov udeo u ukupnom polimernom matriksu, prisustvo vezivnog sredstva i punioca.

Ispitivanja u sledećim poglavljima, bazirana na dizajnu eksperimenta obuhvatiće analizu konstatovanih uticaja formulacionih promenljivih: intragranularnog matriks formirajućeg polimera, njegovog udela u ukupnom polimernom matriksu i prisustva/udela ekstragranularnog polimera na profil brzine rastvaranja leka kao i fizičke attribute tableta.

Uticaj vezivnog sredstva neće biti odvojeno eksperimentalno razmatran, obzirom i na njegov sinergizam sa matriks polimerom u pogledu vezivnih sposobnosti, već će biti primenjena standardna koncentracija od 3 %, preporučena od strane proizvođača, kod izrade čvrstih oblika sa polivinilpirolidon K30. Na osnovu dobijenih fizičkih atributa tableta, pri ispitivanju visoko rizičnih uticaja intragranularnog i ekstragranularnog polimera biće procenjena i prihvatljivost primenjenog vezivnog sredstva i njegovog udela u pogledu kompresibilnih svojstava i dobijenih atributa tableta.

Uticaj prisustva nerastvornog punioca mikrokristalne celuloze na fizičke attribute tableta, neće biti razmatran kroz odvojene eksperimente. Literaturni podaci (Dow, 2009;

Colorcon, 2010) i ranije sprovedena preliminarna ispitivanja sa mikrokristalnom celulozom su pokazala da njegovo prisustvo doprinosi poboljšanju protočnosti mase te će biti primenjen u formulacijama u za tablete preporučenim koncentracijama od 4 %, a kroz dobijene fizičke atribute tableta pri ispitivanju visoko rizičnih uticaja intragranularnog i ekstragranularnog polimera biće procenjena i prihvatljivost prisustva i upotrebljenog udela mikrokristalne celuloze u formulaciji.

### 3.2.3. Procena uticaja intragranularno i ekstragranularno prisutnih matriks formirajućih polimera na brzinu oslobađanja teofilina

#### 3.2.3.1. Metode

##### 3.2.3.1.1. Dizajn eksperimenta

Na osnovu sprovedene inicijalne procene rizika, konstatovano je da intragranularni i ekstragranularni matriks formirajući polimeri imaju visok nivo rizika na profil brzine rastvaranja teofilina te su ove veličine uključene pri planiranju dizajna eksperimenta. Primenjen je pun faktorijalni dizajn sa dve promenljive, na dva nivoa i 3 zavisno promenljive. Kao ekstragranularni matriks formirajući polimer razmatran je karbomer najnovije generacije, Carbopol® 971P NF, a hidroksipropilmetilceluloza (Methocel® K100M) kao intragranularni polimer.

Pregled nezavisno i zavisno promenljivih prikazan je u tabeli 3.2.11.

Tabela 3.2.11. Nezavisno i zavisno promenljive, pun faktorijalni dizajn

<i>Nezavisno promenljive</i>	<i>Nivoi</i>	
	-1	+1
$X_1$ : ukupna količina polimera (Methocel® K100M i Carbopol® 971P NF) u matriksu / mg	60.0	80.0
$X_2$ : količina Carbopol® 971P / %	0.0	12.5
<i>Zavisno promenljive</i>		
$Y_{T25\%}$ : vreme oslobađanja 25 % teofilina $T_{25\%}$		
$Y_{T50\%}$ : vreme oslobađanja 50 % teofilina $T_{50\%}$		
$Y_{8h}$ : procenat oslobođenog teofilina nakon 8h ispitivanja		

Zavisno promenljive su odabrane u skladu sa preporukom evropske farmakopeje Ph Eur 6.0, opšta monografija 2.9.3., *Dissolution test for solid dosage forms*, i preporukama za praćenje dinamike oslobađanja kod tableta sa produženim oslobađanjem, u najmanje tri tačke: posle oslobađanja 20 % - 30 % leka, 50 % i 80 % leka.

Plan eksperimenata sa vrednostima dobijenih zavisno promenljivih je prikazana u tabeli 3.2.12.

Postupak pripreme tableta opisan je u odeljku 3.2.1.2.2. Izrada matriks tableta, a masa je iznosila 490 mg (kod tableta sa ukupno 60 mg polimera) i 510 mg (kod tableta sa

ukupno 80 mg polimera). Razlika u masi pripremljenih tableta (490 mg i 510 mg) bila je manja od 1 % (i u skladu sa farmakopejskim zahtevom za variranje pojedinačne mase tableta, 5 %) te je isključen uticaj različitih masa, na dinamiku oslobađanja leka iz tableta.

Tabela 3.2.12. Plan eksperimenata i vrednosti dobijenih zavisno promenljivih, pun faktorijalni dizajn, formulacije E1-E4

	<i>kodirane vrednosti</i>		<i>realne vrednosti (mg)</i>			<i>zavisno promenljive</i>		
	$X_1$	$X_2$	$X_1$ (HPMC+karbopol)	(HPMC)	$X_2$ (karbopol)	$Y_{T25\%}$ (h)	$Y_{T50\%}$ (h)	$Y_{8h}$ (%)
<b>E1</b>	+1	+1	80.0	70.0	10.0	3.32	7.58	52.35
<b>E2</b>	+1	-1	80.0	80.0	0.0	2.51	5.40	70.52
<b>E3</b>	-1	-1	60.0	60.0	0.0	2.13	4.87	70.04
<b>E4</b>	-1	+1	60.0	52.5	7.5	3.15	7.03	54.42

Dobijene zavisno promenljive - odgovori sistema, uklapani su u matematički model I reda (jednačina 13), kako bi se izračunali potrebni koeficijenti koji opisuju uticaj faktora:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 \quad (13)$$

$b_1, b_2$  predstavljaju faktorske efekte, a  $X_1, X_2$  varirane nezavisno promenljive.

### 3.2.3.2. Rezultati i diskusija

#### 3.2.3.2.1. Karakterizacija fizičkih atributa tableta

Fizički atributi tableta formulacija E1-E4, izrađenih prema planu eksperimenta, prikazani su u tabeli 3.2.13.

Tabela 3.2.13. Fizički atributi tableta, formulacije E1-E4

<b>Parametar</b>	<b>Masa</b> (mg ± Sd)	<b>Čvrstina</b> (N ± Sd)	<b>Frijabilnost</b> (%)
<b>E1</b>	507.7 ± 2.5	186.3 ± 22.4	0.24
<b>E2</b>	509.3 ± 2.7	187.2 ± 15.1	0.35
<b>E3</b>	489.7 ± 2.9	167.4 ± 24.1	0.40
<b>E4</b>	486.9 ± 2.5	182.2 ± 23.5	0.42

Izrađene tablete formulacija E1-E4, pokazale su zadovoljavajući kvalitet u pogledu fizičkih atributa mase, čvrstine i frijabilnosti odnosno dobijene su tablete unapred definisanog oblika i veličine.

Razmotrena je i prihvatljivost upotrebljenih udela vezivnog sredstva (3 % polivinilpirolidon K-30) i nerastvornog punioca mikrokristalne celuloze (4 %) na dobijene fizičke attribute tableta. Dobijeni rezultati ukazuju da je upotrebljeni udeo vezivnog sredstva i punioca, prihvatljiv u pogledu dobijanja željenih parametara tableta.

#### **3.2.3.2.2. *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja teofilina iz tableta**

Rezultati ispitivanja brzina rastvaranja teofilina u toku 8h iz formulacija prema planu eksperimenta, E1-E4, prikazani su tabelarno (tabela 3.2.14.) i grafički (slika 3.2.1.).

Za formulacije samo na bazi hidroksipropilmetilceluloze, nađeno je oslobađanje nešto veće količine teofilina iz tableta sa nižom ukupnom količinom polimera E3 (60 mg hidroksipropilmetilceluloze) u poređenju sa tabletama E2 (80 mg hidroksipropilmetil celuloze), ali je nađena sličnost profila,  $f_2=50.9$ , (Tabela 3.2.15.), uprkos razlici u količini inkorporiranog polimera.

Za formulacije E1 i E4 na bazi intragranularno i ekstragranularno kombinovanih polimera (Methocel® K100M/Carbopol® 971P NF) u matriksu, takođe su dobijeni međusobno slični profili oslobađanja,  $f_2=83.5$ , uprkos razlici u ukupnoj količina polimera i prisustvu karbomera (60 mg i 80 mg / tableti).

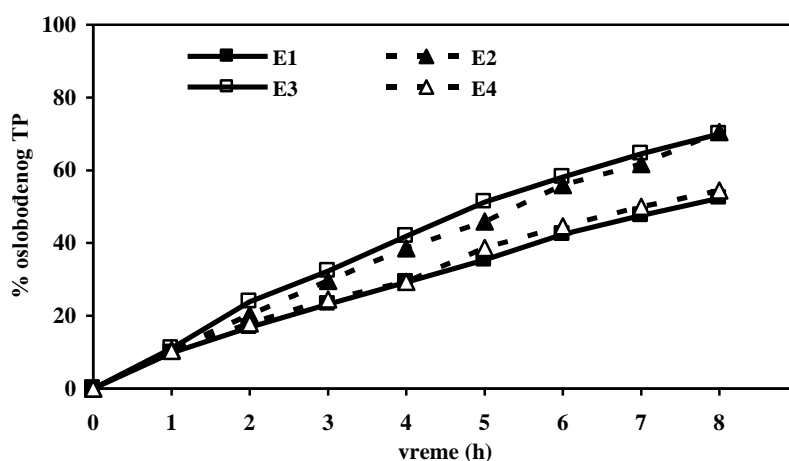
Nađeni odnosi ukazuju da razlika u ukupnoj količini polimera nema uticaja na značajnu promenu dinamike oslobađanja teofilina.

Kod formulacija samo na bazi hidroksipropilmetilceluloze (E2 i E3), nađene su mnogo veće količine oslobođenog leka, u poređenju sa matriksima (E1, E4) koji su sadržali istu ukupnu količinu polimera, ali sa udelom karbomera u količini od 12.5 % (Slika 3.2.1.), što je potvrđeno izračunatim faktorima sličnosti (tabela 3.2.15.). Rezultati su ukazali da, pri inkorporiranju 12.5 % karbomera u hidroksipropilmetilcelulozni matriks dolazi do značajnog usporavanja oslobađanja teofilina.

Rezultati su u skladu sa nađenim podacima u literaturi o usporavanju oslobađanja pri primeni 15 % ili 22.5 % Carbopol® 971P NF u kombinaciji sa Methocel® K4M (Draganoiu i sar., 2005). Dok prema Straubel i sar., 2003, tek pri većem procentnom učešću Carbopol® 934P od 60 % u ukupnom matriksu sa Methocel® K15M, konstatuje se značajnije usporavanje oslobađanja teofilina, a udeli od 20 % i 40 % karbomera, dali su slično oslobađanje kao i sam Methocel® K15M.

Tabela 3.2.14. Brzine rastvaranja teofilina, iz formulacija izrađenih prema matrici eksperimenta pun faktorijalni dizajn, E1, E2 (80 mg ukupnog polimera) E3-E4 (60 mg ukupnog polimera)

brzina oslobađanja teofilina iz tableta				
Vreme/h	E1	E2	E3	E4
1	9,80 ± 0,27	10,60 ± 0,63	11,14 ± 0,51	10,43 ± 0,68
2	16,89 ± 1,07	20,36 ± 1,82	23,92 ± 1,24	17,94 ± 2,43
3	23,16 ± 2,36	29,60 ± 2,67	32,35 ± 1,81	24,49 ± 1,03
4	29,19 ± 1,42	38,56 ± 1,11	41,91 ± 1,34	29,36 ± 2,10
5	35,40 ± 1,92	45,90 ± 1,42	51,38 ± 1,07	38,64 ± 1,10
6	42,42 ± 1,72	55,96 ± 1,45	58,17 ± 1,89	44,66 ± 1,14
7	47,67 ± 1,75	61,71 ± 1,74	64,51 ± 2,2	50,09 ± 0,92
8	52,35 ± 1,03	70,52 ± 2,57	70,04 ± 2,69	54,42 ± 1,39



Slika 3.2.1. Profili brzine rastvaranja teofilina iz formulacija E1-E4



Tabela 3.2.15. Faktor sličnosti i izračunati kinetički parametri za formulacije E1–E4

<b><i>Faktor sličnosti</i></b>					
<b>f2</b>	<b>E1 - E2</b>	<b>E3 - E4</b>	<b>E1 - E4</b>	<b>E2 - E3</b>	
	47.9	74.6	83.51	46.9	
<b><i>Izračunati kinetički parametri</i></b>					
<b>Model</b>	<b>Parametri</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b>E3</b>	<b>E4</b>
<b>Nultog reda</b>	$r^2$	0.9963	0.998	0.993	0.995
	$k_0(\text{min}^{-1})$	0.10	0.14	0.14	0.11
	Lag/Burst (min)	4.5	-25.5	6.6	4.9
<b>Higuchi model</b>	$r^2$	0.994	0.995	0.998	0.993
	$k_2(\text{min}^{-0.5})$	3.07	4.25	4.23	3.21
	Lag/Burst (min)	-16.4	-25.5	-22.6	-16.9
<b>Peppasov model</b>	$r^2$	0.999	0.999	0.997	0.998
	$k_p(\text{min}^{-n})$	0.35	0.26	0.31	0.38
	Lag/Burst (min)	-0.4	0.5	0.4	-0.4
	<b><i>n</i></b>	<b>0.82</b>	<b>0.91</b>	<b>0.88</b>	<b>0.81</b>

Na osnovu prikazanih rezultata potvrđeno je, da se usporavanje oslobađanja postiže i kod hidroksipropilmetilceluloze visokog viskoziteta K100M, a ne samo u slučaju korišćenja hidroksipropilmetilceluloze K4M (Perez-Marcos i sar., 1994 i 1996; Draganoiu i sar., 2005) ili K15M (Straubel i sar., 2003) u kombinaciji sa Carbopolom® 971P, što nije zabeleženo u literaturi. Dobijeno je značajno usporavanje oslobađanja teofilina iako je u odnosu na literaturne podatke (15 %, 22.5 %, 60 %) primenjen značajno niži udeo karbomera 12.5 %, a nađeno usporavanje oslobađanja bi se verovatno moglo pripisati sinergističkom efektu prisutna dva polimera (Draganoiu i sar., 2005; Smith, 2009).

### 3.2.3.2.3. Analiza profila brzine rastvaranja teofilina iz tableta primenom model-zavisnih metoda

Uklapanjem profila u matematičke modele proizilazi, da teže modelu kinetike nultog reda, mada se uklapaju i u Higuchi i Peppasov model (Tabela 3.2.15.). Konstante brzine oslobađanja su viših i sličnih vrednosti kod matriksa na bazi hidroksipropilmetilceluloze, a nižih vrednosti kod kombinovanih Methocel® K100M/Carbopol® 971P NF sistema. Izračunate vrednosti difuzionog koeficijenta, kod tableta samo sa hidroksipropilmetilcelulozom su  $n=0.88-0.91$ , ukazujući da se lek

oslobađa približno mehanizmom Case II transporta, kinetikom nultog reda, odnosno, u slučaju višeg ukupnog udela polimera procesom relaksacije kao dominantnim.

Kod Methocel® K100M/Carbopol® 971P NF matriksa vrednost  $n = 0.81-0.82$ , te je proces anomalnog transporta, odnosno zastupljenosti difuzije i relaksacije prisutna pri oslobađanju leka.

#### 3.2.3.2.4. Analiza faktorskih efekata

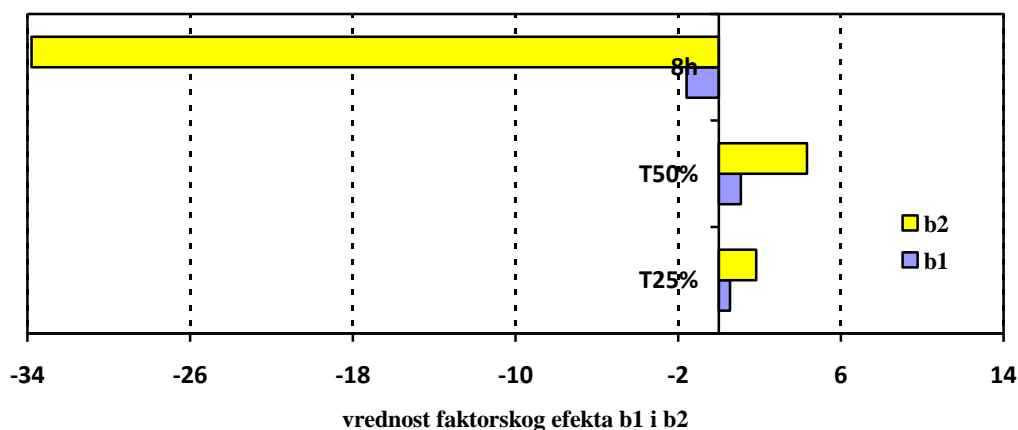
Analiza faktorskih efekata, kod dizajniranih formulacija E1-E4, vršena je uklapanjem dobijenih rezultata u matematički model I reda i prikazana jednačinama (14 – 16) i grafički (slika 3.2.2):

$$Y_{T25\%} = 2.78 + 0.55 X_1 + 1.83 X_2 \quad (14)$$

$$Y_{T50\%} = 6.22 + 1.08 X_1 + 4.34 X_2 \quad (15)$$

$$Y_{8h} = 15.46 - 1.59 X_1 - 33.79 X_2 \quad (16)$$

Nakon oslobađanja 25 % i 50 % teofilina, oba faktorska efekta imaju pozitivan predznak, što ukazuje da oba direktno proporcionalno utiču na vreme potrebno da se oslobodi željena količina leka iz matriks tableta, odakle proističe da zapravo utiču indirektno na brzinu oslobađanja leka (usporavaju je). Shodno tome se sa porastom vrednosti promenljivih povećava potrebno vreme za oslobađanje, odnosno usporava brzina oslobađanja leka.



Slika 3.2.2. Vrednosti faktorskih efekata na odgovor  $Y_{T25\%}$ ,  $Y_{T50\%}$  i  $Y_{8h}$

Kod faktora  $Y_{8h}$  oba faktorska efekta imaju negativan predznak, odnosno obrnuto proporcionalno utiču na brzinu oslobađanja.

Veću apsolutnu vrednost ima konstanta uz faktor  $X_2$  – udeo karbomera u ukupnom polimernom matriksu, a time i veći uticaj na oslobađanje leka.

Iz literature je poznato da karbomer pripada pH zavisnim polimerima i da je bubrenje i formiranje gel sloja usporeno u početnoj fazi, a nepotpuno u nižim pH vrednostima. Ovakvi uslovi bili su prisutni u toku prvih sati ispitivanja tableta, te se pomenutim efektima može pripisati usporeno bubrenje karbomera, tako da oslobađanje leka zavisi prvenstveno od brzine rastvaranja i difuzije molekula sa površine (Lubrizol, 2011a, 2011c), a tek u kasnijoj fazi posle formiranja stabilnog gel sloja isti određuje brzinu oslobađanja leka. Verovatno se time mogu objasniti i niske vrednosti konstante uz  $X_2$  u prvim satima oslobađanja teofilina, odnosno više vrednosti u kasnijoj fazi ispitivanja

Na osnovu dobijenih rezultata konstatuje se usporeno oslobađanje leka i kod kombinacije HPMC visokog viskoziteta K100M sa Carbopolom® 971P, što nije zabeleženo u literaturi.

Postignuto je značajno usporavanje u oslobađanju teofilina, iako je u odnosu na literaturu (15 %, 22.5 %, 60 %) primenjen značajno niži udeo karbomera od 12.5 %.

Analizom faktorskih efekata, nađena je obrnuto proporcionalna zavisnost, količine karbomera u matriksu, na brzinu oslobađanja leka, dok je uticaj ukupne količine polimernog matriksa malog uticaja i prvenstveno u početnoj fazi ispitivanja.

Nađeno usporavanje oslobađanja teofilina verovatno se može pripisati sinergističkom efektu prisutna dva polimera (Draganoiu i sar., 2005). Pri čemu u prvaj fazi dominira uticaj intragranularno prisutnog HPMC-a na oslobađanje teofilina, a u kasnijoj fazi dominira ekstragranularno dodat karbomer usled nagrađenog jačeg gel sloja.

Takođe dobijeni fizički atributi kvaliteta tableta su prihvatljivih vrednosti, što ukazuje da upotrebljeni intragranularni i ekstragranularni udeli polimera, kao i odabran udeo vezivnog sredstva i nerastvornog punioca mikrokristalne celuloze obezbeđuju dobra protočna, kompresibilna svojstva i attribute kvaliteta tableta.

### 3.2.4. Primena eksperimentalnog dizajna smeše u razvoju formulacije matriks tableta na bazi intragranularno i ekstragranularno kombinovanih polimera

#### 3.2.4.1. Metode

##### 3.2.4.1.1. Dizajn eksperimenta

Eksperimentalni dizajn smeše (*Mixture Experimental Design*) je primenjen za razvoj formulacije matriks tableta uz analizu uticaja kritičnih atributa na brzinu oslobađanja leka (udela ekstragranularnog polimera Carbopol® 971P i udela intragranularnog polimera HPMC dva različita visoka viskoziteta Methocel® K4M i Methocel® K100M).

Prema eksperimentalnom dizajnu smeše postavljena su 2 seta eksperimenata, svaki sa jednim tipom hidroksipropilmetilceluloze (F1 do F8 i F9 do F16) sa po 8 model formulacija, uključujući 3 ponavljanja (F6-F8 i F14-F16). U formulacijama su varirana dva faktora, a ispitivan je njihov uticaj na brzinu oslobađanja teofilina (tabela 3.2.16.).

Tabela 3.2.16. Pregled nezavisno i zavisno promenljivih obuhvaćenih eksperimentalnim dizajnom smeše

Nezavisno promenljive	Nivoi	
	-1	+1
$X_1$ : frakcija HPMC u ukupnoj količini polimera	0.75	1.00
$X_2$ : frakcija karbomera u ukupnoj količini polimera	0.00	0.25
<b>Zavisno promenljive</b>		
$Y_{2h}$ : procenat oslobođenog teofilina nakon 2h ispitivanja		
$Y_{4h}$ : procenat oslobođenog teofilina nakon 4h ispitivanja		
$Y_{6h}$ : procenat oslobođenog teofilina nakon 6h ispitivanja		
$Y_{8h}$ : procenat oslobođenog teofilina nakon 8h ispitivanja		

Ukupna količina polimera je nepromenljive vrednosti - 80 mg.  $X_1 + X_2 = 1$ .

Nezavisno promenljive i njihovi nivoi su usvojeni na osnovu prethodno sprovedenih ispitivanja. Viša vrednost ukupne količine polimera od 80 mg, kako bi se ispoštovala i preporuka da ukupna količina polimera u formulaciji bude ne manja od 20 % u cilju uspostavljanja i održavanja stabilne dinamike usporenog oslobađanja i postizanja robustnosti formulacije (Ford i sar., 1985; Smith, 2009). Vrednost gornjeg nivoa udela

karbomera u ukupnom polimernom matriksu je povećana na 25 % radi sveobuhvatnije analize njegovog uticaja. Pored hidroksipropilmetilceluloze tipa K100M kao najvišeg viskoziteta i najkompleksnijeg upotrebljen je i niži tip viskoziteta K4M (u literaturi korišćen u nižoj koncentraciji od 50 mg po tableti, Draganoiu i sar., 2005), a za koji je iz prakse i literature (Colorcon, 2010) poznato da se često koristi u formulacijama sa modifikovanim oslobađanjem, upravo zbog svojih osobina uspostavljanja umerenog ali stabilnog režima usporenog oslobađanja. Nivoi nezavisno promenljive  $X_1$  za udeo HPMC u ukupnom polimernom matriksu su postavljeni u opsegu od 0.75 delova do 1.00 (60 mg - 80 mg), a frakcija karbomera ( $X_2$ ) od 0.00 - 0.25 (0–20 mg), što odgovara učešću od 25 % u ukupnom matriksu.

Plan eksperimenata sa kodiranim i realnim vrednostima nezavisno promenljivih prikazana je u tabeli 3.2.17.

Tabela 3.2.17. Plan eksperimenata sa kodiranim i realnim vrednostima nezavisno promenljivih, za eksperimentalni dizajn smeše, formulacije F1-F8 (HPMC K100M) F9-F16 (HPMC K4M)

HPMC K100M	HPMC K4M	<i>kodirane vrednosti</i>		<i>realne vrednosti</i>	
		$X_1$ (HPMC)	$X_2$ (karbomer)	$X_1$ (HPMC)	$X_2$ (karbomer)
<b>F1</b>	<b>F9</b>	1.000	0.000	80.00	0.00
<b>F2</b>	<b>F10</b>	0.875	0.125	70.00	10.00
<b>F3</b>	<b>F11</b>	0.750	0.250	60.00	20.00
<b>F4</b>	<b>F12</b>	0.937	0.063	75.00	5.00
<b>F5</b>	<b>F13</b>	0.812	0.188	65.00	15.00
<b>F6</b>	<b>F14</b>	0.750	0.250	60.00	20.00
<b>F7</b>	<b>F15</b>	1.000	0.000	80.00	0.00
<b>F8</b>	<b>F16</b>	0.875	0.125	70.00	10.00

Analiza uticaja nezavisno promenljivih na dinamiku oslobađanja leka, sprovedena je u više koraka. Najpre je programski kroz Design Expert procenjen optimalni matematički model (između raspoloživih: linearnog, kvadratnog i kubnog modela), putem analize statističkih parametara: predviđene rezidualne sume kvadrata /*PRESS*/, prilagođenog multipnog korelacionog koeficijenta /*Adjusted R<sup>2</sup>*/ i prilagođenog multipnog korelacionog koeficijenta /*Predicted R<sup>2</sup>*/ . Pri odabiru je potrebno da *PRESS* – vrednost odabranog modela bude najniže vrednosti u odnosu na ostale analizirane. Najbolje uklapanje podataka dobijeno je pri primeni linearnog matematičkog modela (jednačina

17), a u slučaju HPMC K100M matriksa kvadratni model (jednačina 18) je dao bolje rezultate:

$$Y = b_1 X_1 + b_2 X_2 \quad (17)$$

$$Y = b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_{12} X_1 X_2 \quad (18)$$

Potom je odabrani matematički model korišćen za izračunavanje vrednosti faktorskih efekata koeficijenata  $b_1$ ,  $b_2$  i  $b_{12}$  uz  $X_1$  i  $X_2$  ili njihovu kombinaciju  $X_1 X_2$ , kako bi se procenio uticaj nezavisno promenljivih na dinamiku osolobađanja teofilina.

Vrednosti  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_{12}$  odražavaju efekat nezavisno promenljivih  $X_1$  i  $X_2$  na zavisno promenljive. Pozitivni znak ispred koeficijenta ukazuje na sinergistički uticaj, a veća apsolutna vrednost koeficijenta na veći uticaj nezavisno promenljive na zavisno promenljivu.

### 3.2.4.2. Rezultati i diskusija

#### 3.2.4.2.1. Karakterizacija fizičkih atributa kvaliteta tableta

Fizički atributi kvaliteta tableta formulacija F1-F8 i F9-F16, prikazani su u tabeli 3.2.18.

Tabela 3.2.18. Fizički atributi kvaliteta tableta, formulacije F1–F16

Parametar	Masa (mg ± Sd)	Čvrstina (N ± Sd)	Frijabilnost (%)
<b>HPMC K100M / Carbopol 971</b>			
F1	510.1 ± 2.4	186.3 ± 9.3	0.28
F2	508.5 ± 4.1	175.0 ± 19.2	0.24
F3	511.9 ± 4.9	186.3 ± 9.3	0.26
F4	508.9 ± 3.8	178.5 ± 14.7	0.35
F5	509.8 ± 5.7	177.3 ± 13.6	0.34
F6	512.7 ± 2.9	174.9 ± 11.1	0.22
F7	511.5 ± 2.6	179.2 ± 12.2	0.25
F8	508.6 ± 4.6	175.7 ± 14.2	0.31
<b>HPMC K4M / Carbopol 971</b>			
F9	510.6 ± 3.4	175.2 ± 15.6	0.45
F10	512.6 ± 2.7	177.6 ± 12.4	0.32
F11	512.1 ± 2.3	167.4 ± 7.4	0.24
F12	511.2 ± 2.9	179.4 ± 14.9	0.15
F13	511.4 ± 3.3	180.4 ± 17.4	0.22
F14	511.5 ± 2.1	176.4 ± 16.2	0.29
F15	510.9 ± 2.8	178.8 ± 16.1	0.36
F16	510.5 ± 2.3	180.3 ± 13.8	0.38

Izrađene tablete svih formulacija F1-F8 i F9-F16, pokazale su zadovoljavajući kvalitet u pogledu fizičkih atributa kvaliteta mase, čvrstine i frijabilnosti, ukazujući da se unapred definisani zahtev *CQA* gotovog proizvoda koji se odnosi na fizički atribut oblik i veličinu tablete ispunjava.

### 3.2.4.2.2. *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja teofilina iz tableta

Profili brzine rastvaranja teofilina iz matriks formulacija, na osnovu plana eksperimenta dizajna smeše, sa različitim udelom karbopol-a u dva tipa hidroksipropilmetilceluloznog matriksa (Methocel® K100M, Methocel® K4M), prikazani su u tabeli 3.2.19.-3.2.20.

Faktori razlike i faktori sličnosti dobijenih profila dati su u tabeli 3.2.21., a grafički prikazi na slici 3.2.3 i 3.2.4.

Tabela 3.2.19. Brzine rastvaranja teofilina, iz formulacija izrađenih prema planu eksperimenta dizajna smeše, korišćenjem kombinacije polimera Methocel® K100M i Carbopol® 971P NF

<b><i>Methocel® / Carbopol® 971P NF</i></b>								
<b>T/h</b>	<b>80/0 F1</b>	<b>70/10 F2</b>	<b>60/20 F3</b>	<b>75/5 F4</b>	<b>65/15 F5</b>	<b>60/20 F6</b>	<b>80/0 F7</b>	<b>70/10 F8</b>
<b>1</b>	10.8±0.51	9.8±0.42	8.7±0.14	9.4±0.40	9.1±0.15	8.9±0.45	10.4±0.58	9.8±0.12
<b>2</b>	20.4±1.22	17.1±0.45	14.4±0.35	17.6±0.61	15.2±0.90	14.5±0.51	20.3±0.56	16.7±0.3
<b>3</b>	30.2±1.92	23.4±0.54	19.4±0.09	24.85±0.54	21.4±1.10	20.6±1.96	28.9±1.01	22.9±0.18
<b>4</b>	39.3±1.43	29.3±0.61	24.7±0.35	32.3±0.66	27.1±0.50	25.43±1.61	37.8±0.26	29.1±0.28
<b>5</b>	46.7±1.70	35.4±0.92	29.8±0.47	39.9±2.09	32.6±1.20	30.7±1.49	45.1±1.40	35.4±0.26
<b>6</b>	56.7±1.98	42.5±0.72	34.4±0.75	47.3±0.30	38.6±0.90	34.6±0.91	55.2±0.34	42.3±0.15
<b>7</b>	62.9±2.08	47.7±0.73	38.7±0.34	52.5±0.24	43.6±1.86	40.2±1.45	60.5±1.50	47.6±0.27
<b>8</b>	72.0±2.69	52.4±1.04	43.0±0.43	58.5±0.65	49.2±2.44	44.0±1.84	69.0±0.20	52.3±0.67

Tabela 5.20. Brzine rastvaranja teofilina, iz formulacija izrađenih prema planu eksperimenta dizajna smeše, korišćenjem kombinacije polimera Methocel® K4M i Carbopol® 971P NF

<b><i>Methocel® / Carbopol® 971P NF</i></b>								
<b>T/h</b>	<b>80/0 F9</b>	<b>70/10 F10</b>	<b>60/20 F11</b>	<b>75/5 F12</b>	<b>65/15 F13</b>	<b>60/20 F14</b>	<b>80/0 F15</b>	<b>70/10 F16</b>
<b>1</b>	15.5±0.57	15.5±0.67	11.4±0.58	15.1±1.08	13.3±1.14	10.5±0.97	14.4±0.63	13.7±0.17
<b>2</b>	30.8±0.78	24.8±0.68	19.9±0.56	27.6±0.61	21.2±1.18	17.7±0.62	27.7±1.61	22.7±1.11
<b>3</b>	41.0±1.80	31.5±0.62	24.4±1.01	35.5±1.03	27.4±1.01	20.8±1.04	39.4±1.07	28.9±0.18
<b>4</b>	50.6±1.22	37.9±1.56	29.9±0.26	43.3±0.66	33.1±1.02	28.3±1.43	51.9±2.00	36.1±0.80
<b>5</b>	58.5±1.54	46.2±1.04	35.4±1.40	52.8±1.47	39.8±1.02	32.7±1.49	60.8±2.19	43.0±1.69
<b>6</b>	66.9±3.34	53.2±0.89	41.4±0.34	59.8±0.24	46.6±2.27	38.6±2.10	69.7±2.14	51.3±1.89
<b>7</b>	73.4±1.62	59.6±0.84	46.4±1.50	65.4±0.97	51.1±1.02	42.2±1.45	74.5±2.17	58.3±1.31
<b>8</b>	80.7±4.37	65.9±3.32	51.5±0.20	72.9±1.39	56.8±0.59	48.0±1.11	82.5±3.00	63.9±3.02

Tabela 5.21. Vrednosti faktora razlike f1 i faktora sličnosti f2 dobijenih profila, formulacija F1-F16

<b><i>realne vrednosti</i></b>		<b><i>HPMC K100M/Carbopol 971P NF</i></b>			<b><i>HPMC K4M / Carbopol 971P NF</i></b>		
<b><i>X<sub>1</sub></i></b>	<b><i>X<sub>2</sub></i></b>	<b><i>F</i></b>	<b><i>f1</i></b>	<b><i>f2</i></b>	<b><i>F</i></b>	<b><i>f1</i></b>	<b><i>f2</i></b>
80.00	0.00	<b>F1</b>	-	-	<b>F9</b>	-	-
70.00	10.00	<b>F2</b>	32	46	<b>F10</b>	19	48
60.00	20.00	<b>F3</b>	59	37	<b>F11</b>	36	34
75.00	5.00	<b>F4</b>	20	55	<b>F12</b>	10	61
65.00	15.00	<b>F5</b>	43	42	<b>F13</b>	30	38
60.00	20.00	<b>F6</b>	55	38	<b>F14</b>	41	31
80.00	0.00	<b>F7</b>	3	85	<b>F15</b>	4	83
70.00	10.00	<b>F8</b>	32	46	<b>F16</b>	23	44
<b>HPMC K100M</b>		<b><i>f1</i></b>	<b><i>f2</i></b>		<b><i>f1</i></b>	<b><i>f2</i></b>	
<b>F2 – F4</b>		9.9	70.4		<b>F4 – F5</b>	16.8	49.1
<b>F2 - F5</b>		8.0	76.4		<b>F3 – F6</b>	2.7	93.9
<b>F2 – F8</b>		0.6	99.4				
<b>HPMC K4M</b>		<b><i>f1</i></b>	<b><i>f2</i></b>		<b><i>f1</i></b>	<b><i>f2</i></b>	
<b>F10 – F12</b>		11.5	63.5		<b>F12-F13</b>	22.3	47.3
<b>F10 – F13</b>		13.5	60.4		<b>F11-F14</b>	8.22	75.8
<b>F10 – F16</b>		5.0	81.3				



Vrednosti faktora sličnosti i faktora razlike najpre su izračunavani u odnosu na formulaciju F1 i F9, koje predstavljaju matriks samo na bazi Methocel® K100M ili Methocel® K4M.

Pri ovim poređenjima, nađene su razlike u profilima brzine rastvaranja (tabela 3.2.21.) za sve formulacije (izuzev replikata), odnosno dobijene vrednosti su bile  $f_1 > 15$ , a  $f_2 < 50$ .

Izuzetak u oba seta eksperimenata su formulacije F7 i F15, koje predstavljaju replikat (ponavljanje) eksperimenta F1 i F9 pa su stoga, očekivano, oba profila slična.

Takođe kod formulacije F4 (75 mg/5 mg), u poređenju sa F1 (Methocel® K100M) matriks nađeno je  $f_1=20$  (što odgovara profilima koji nisu slični) a kod F12 (75 mg/5 mg), u pređenju sa F9 (Methocel® K4M) matriks istog odnosa dobijena je sličnost profila ( $f_1=10$  i  $f_2=61$ ).

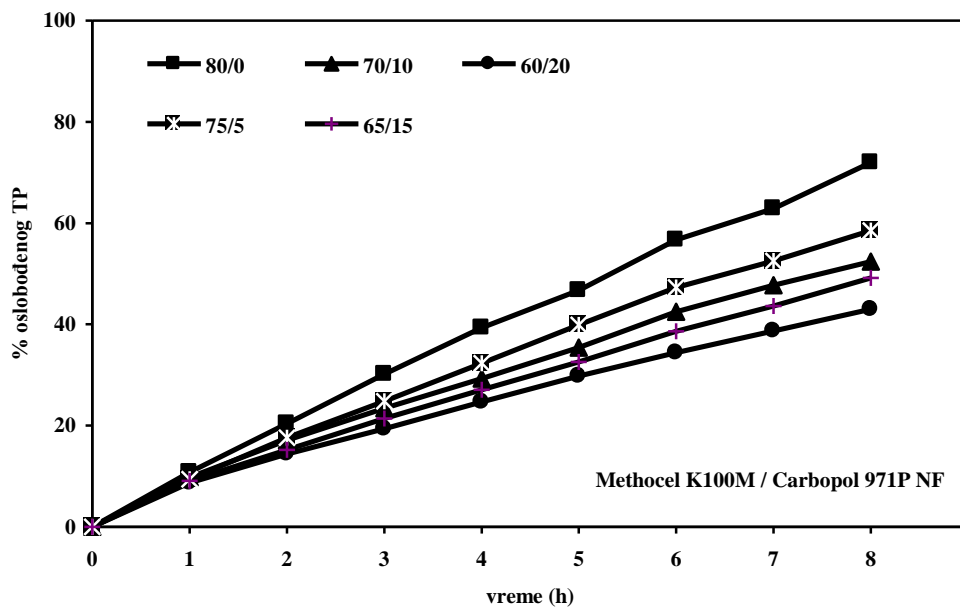
Na osnovu vrdnosti  $f_1$  i  $f_2$ , odnosno sličnosti profila oslobađanja, proizilazi da primena karbomera sa udelom 0.125 w/w (70 mg/10 mg) i više u hidroksipropilmetilceluloznom matriksu daje usporavanje oslobađanja teofilina, odnosno niži udeo od 0.063 w/w (75 mg/5 mg), predstavlja granični slučaj, koji može dati varijabilne rezultate.

Najveće usporavanje brzine oslobađanja leka posle 8 sati ispitivanja dobijeno je kod matriksa F3 i F6 koji su sadržali maksimalni udeo od 0.250 w/w karbomera (60 mg/20 mg) u kombinaciji sa Methocel® K100M (oslobođeno manje od 45 % teofilina) odnosno F11 i F14 sa Methocel® K4M (nađeno 51.5 % leka).

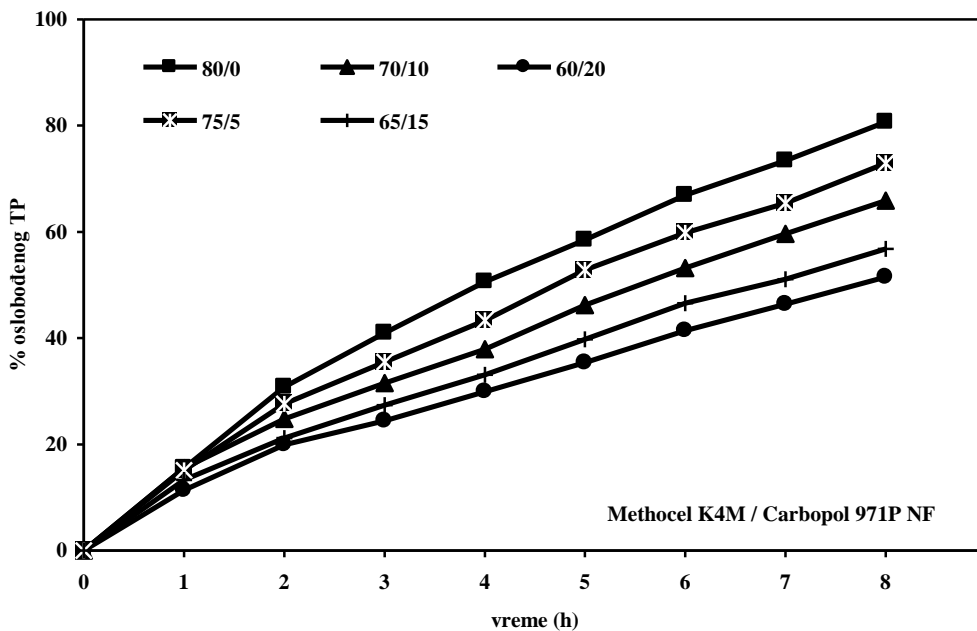
Najveće oslobađanje leka dali su matriksi samo na bazi hidroksipropilmetilceluloze, odnosno iz Methocel® K100M (F1, F7) je posle 8h ispitivanja nađeno 69 % i 72 %, a iz Methocel® K4M (F9, F15) 80 % i 82 % teofilina. Kod ostalih formulacija kako se proporcionalno povećavao udeo karbomera, smanjivala se količina oslobođenog leka posle 8h ispitivanja:

**F4, F12 (75/5mg) < F2 = F8, F10 = F16 (70 / 10mg) < F5, F13 (65 / 15mg),**

ali je ipak izračunavanjem dobijena sličnost profila kod F2 - F4 - F8 i F10 – F12 – F16 (tabela 3.2.21.) za oba tipa viskoziteta hidroksipropilmetilceluloze, izuzev odnosa F4-F5 i F12-F13 gde je konstatovana razlika profila ( $f_2=49.1$  i  $f_2=47.2$ ).



Slika 3.2.3. Oslobađanje teofilina iz matriks tableta na bazi različitog odnosa kombinacije polimera Methocel® K100M i Carbopol® 971P NF, u fiksnoj ukupnoj količini matriksa.



Slika 3.2.4. Oslobađanje teofilina iz matriks tableta na bazi različitog odnosa kombinacije polimera Methocel® K4M i Carbopol® 971P NF, u fiksnoj ukupnoj količini matriksa.

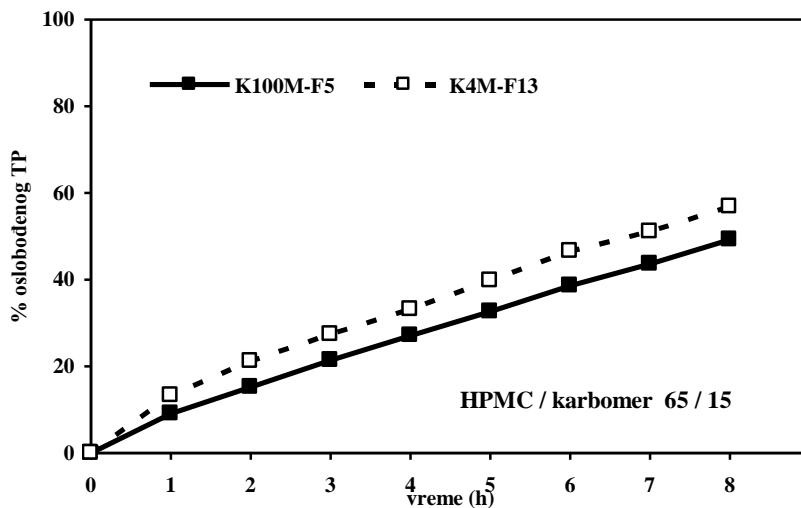
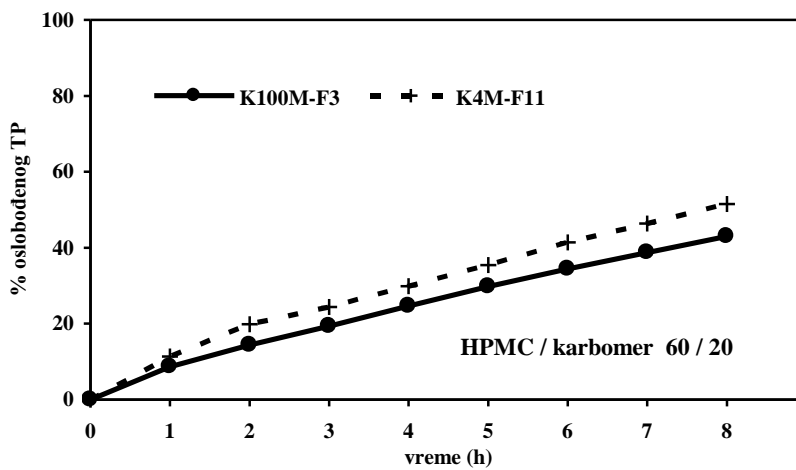
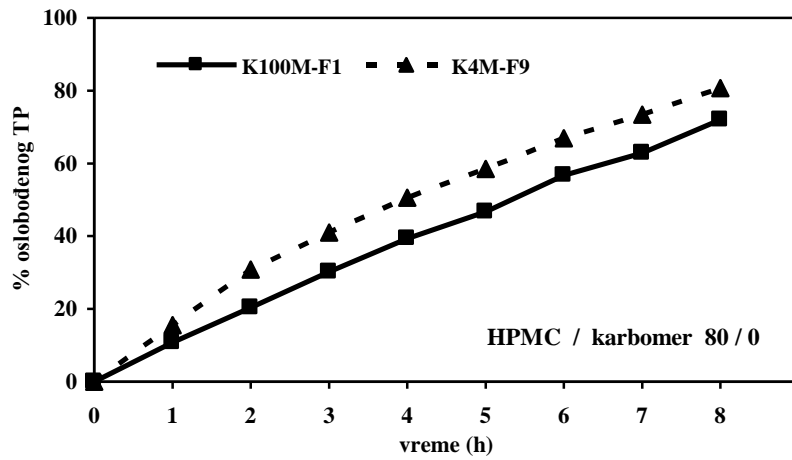
Poređenje profila oslobađanja teofilina iz formulacija sa istim udelom polimera, ali iz različitih setova eksperimenata (različiti viskoziteti hidroksipropilmetilceluloze), prikazano je grafički, slika 3.2.5., a izračunati faktori sličnosti i razlike dati su u tabeli 3.2.22.

Tabela 3.2.22. Vrednosti faktora razlike  $f_1$  i faktora sličnosti  $f_2$  za analizirane profile unutar različitih setova eksperimenata, ali sa istim udelima polimera.

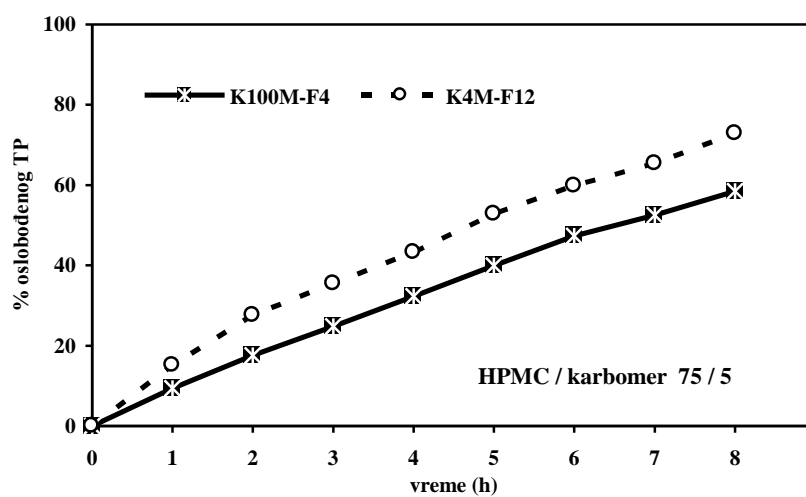
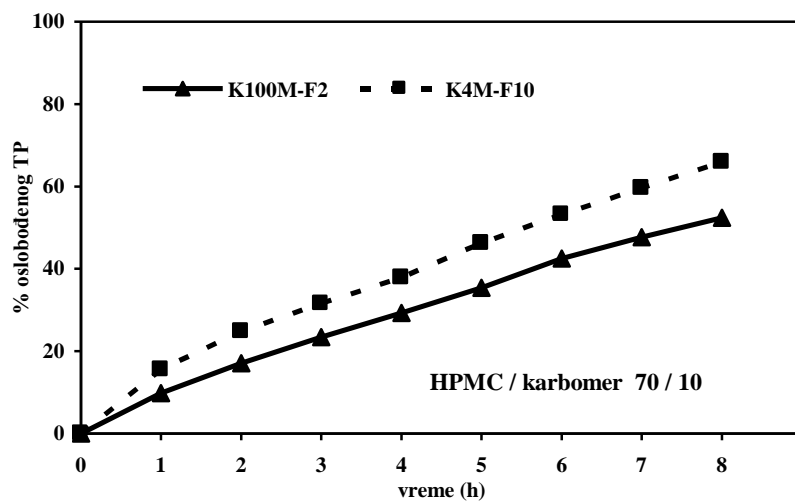
<b>K100M – K4M</b>	<b>Udeo polimera (mg)</b>	<b><math>f_1</math></b>	<b><math>f_2</math></b>
<b>F1 K100M – F9 K4M</b>	80.0 / 0.0	21.8	49.9
<b>F7 K100M – F15 K4M</b>		28.5	45.4
<b>F3 K100M - F11 K4M</b>	60.0 / 20.0	13.1	60.3
<b>F6 K100M - F14 K4M</b>		9.1	76.5
<b>F5 K100M - F13 K4M</b>	65.0 / 15.0	12.1	58.6
<b>F2 K100M - F10 K4M</b>	70.0 / 10.0	12.9	58.1
<b>F8 K100M – F16 K4M</b>		14.2	54.4
<b>F4 K100M – F12 K4M</b>	75.0 / 5.0	31.9	46.8

Poređenjem formulacija sa istim udelom polimera, ali na bazi hidroksipropilmetilceluloze različitih viskoziteta, sledi da su profili oslobađanja na bazi samo K100M ili samo K4M (F1-F9, F7-F15) različiti ( $f_1=28.5$ ,  $f_2=45.4$ ), dok su kod formulacije sa maksimalnim udelom karbopola (F3-F11, F6-F14) slični ( $f_1=9.1$ ,  $f_2=76.5$ ), bez obzira na razlike u viskozitetu upotrebljene hidroksipropilmetilceluloze.

Sa smanjenjem udela karbomera, krive zavisnosti oslobađanja zadržavaju trend i sličnost, ali se uočavaju razlike u količini oslobođenog teofilina u toku vremena između formulacija. Sličnost profila zadržavaju formulacije F2-F10 i F8-F16, a razlika ( $f_2=46.8$ ) se konstatuje kod formulacija F4-F12 (učešće karbomera 5 mg, odnosno u procentima 6.25 % u ukupnom matriksu).



Slika 5.5. Uticaj viskoziteta hidroksipropilmetilceluloze (Methocel® K100M ili K4M) u kombinaciji sa Carbopol® 971P NF na oslobađanje teofilina iz matriksa sa istim udelom polimera



Slika 5.5. (nastavak) Uticaj viskoziteta hidroksipropilmetilceluloze (Methocel® K100M ili K4M) u kombinaciji sa Carbopol® 971P NF na oslobađanje teofilina iz matriksa sa istim udelom polimera

Dobijeni rezultati usporavanja oslobađanja u prisustvu karbomera su u saglasnosti sa malobrojnim raspoloživim literaturnim podacima, a objašnjavaju se prisutnim sinergističkim delovanjem polimera (Dragainou i sar 2005; Smith, 2009). Nisu nađene značajne razlike u pogledu ponašanja matriksa karbomera sa Methocel® K4M koji je literaturno obrađivan i Methocel® K100M. I ovim ispitivanjima je potvrđeno da se usporavanje oslobađanja postiže u prisustvu koncentracije karbomera od 12,5 % (što odgovara odnosu 70 mg/10 mg) ali i 25 % (odnos 60 mg/20mg). Kritična vrednost udela karbomera radi postizanja stabilnog oslobađanja je da koncentracija bude veća od 6,6 % (što odgovara odnosu 75 mg/5 mg). Slično ponašanje bez obira na razlike u viskozitetu hidroksipropilmetilceluloze, potvrđuje pretpostavku da u kasnijoj fazi oslobađanja dominira karbomer.

Sva ispitivanja su pokazala, da su dobijene tablete zadovoljavajućih parametara i prihvatljivih profila, te da se formulacije mogu uključiti u proces optimizacije.

#### **3.2.4.2.3. Analiza profila brzine rastvaranja teofilina iz tableta primenom model-zavisnih metoda**

Izračunati kinetički parametri: konstanta brzine oslobađanja nultog reda  $k_0$ , kvadratnog korena  $k_2$  i Korsmayer-Peppasovim modelom  $k_p$ , difuzioni eksponent  $n$ , koeficijent korelacije  $r^2$  i *Lag/burst* efekat (efekat odloženog/naglog oslobađanja), prikazani su u tabeli 3.2.23.

Kod oba seta eksperimenata brzine oslobađanja, u skladu sa modelom kinetike nultog reda i kvadratnog korena, smanjuju se po vrednosti sa povećanjem udela karbomera u HPMC matriksu. Najsporije oslobađanje je nađeno kod formulacija koje sadrže 25 % karbomera F3 i F11, ( $2.46 \text{ min}^{-0.5}$  sa K100M;  $2.71 \text{ min}^{-0.5}$  sa K4M) odnosno ponovljene formulacije F6 i F14, nešto brže oslobađanje u formulacijama sa manjim udelom karbomera 65/15 w/w F5 i F13 ( $2.86 \text{ min}^{-0.5}$  sa K100M;  $3.09 \text{ min}^{-0.5}$  sa K4M), potom kod F2 i F10 70/10 w/w ( $3.07 \text{ min}^{-0.5}$  kod K100M;  $3.58 \text{ min}^{-0.5}$  kod K4M) i F8 ( $3.08 \text{ min}^{-0.5}$ ), a najveća brzina kod tableta samo sa Methocel® K100M, F1 ( $4.34 \text{ min}^{-0.5}$ ) odnosno F9  $4.62 \text{ min}^{-0.5}$  za K4M. Formulacije zasnovane na hidroksipropilmetilcelulozi višeg viskoziteta K100M i karbomeru pokazale su manju brzinu oslobađanja, nego formulacije sa Methocel® K4M i karbomerom u istom polimernom odnosu. Rezultati potvrđuju prethodnu pretpostavku zasnovanu na različitoj sposobnosti geliranja Methocel® K100M i K4M, uz sinergističku interakciju između polimera.

Tabela 3.2.23. Kinetički parametri: konstanta brzine oslobađanja nultog reda  $k_0$ , kvadratnog korena  $k_2$  i Korsmayer-Peppasovim modelom  $k_p$ , difuzioni eksponent  $n$ , koeficijent korelacije  $r^2$  i *Lag/Burst* efekat, formulacije F1-F16

Run	Nultog reda			Higuchi model			Pepasov model			
	$r^2$	$k_0$ (min <sup>-1</sup> )	Lag/Burst (min)	$r^2$	$k_2$ (min <sup>-0.5</sup> )	Lag/Burst (min)	$r^2$	$k_p$ (min <sup>-n</sup> )	Lag/Burst (min)	$n$
<i>Methocel® K4M/ Carbopol® 971P NF</i>										
<b>F1</b>	0.998	0.14	- 23.5	0.995	4.34	6.0	0.999	0.27	1.6	0.91
<b>F2</b>	0.997	0.10	- 45.0	0.995	3.07	5.3	0.999	0.36	1.2	0.81
<b>F3</b>	0.998	0.08	- 55.9	0.995	2.46	5.0	0.999	0.35	1.5	0.78
<b>F4</b>	0.998	0.12	- 30.1	0.995	3.54	5.8	0.999	0.26	0.0	0.88
<b>F5</b>	0.999	0.09	- 40.9	0.993	2.86	5.4	0.999	0.31	1.8	0.82
<b>F6</b>	0.997	0.08	- 57.4	0.996	2.52	4.9	0.999	0.36	1.0	0.78
<b>F7</b>	0.998	0.14	- 25.6	0.995	4.16	5.9	0.999	0.27	0.8	0.90
<b>F8</b>	0.998	0.10	- 42.2	0.994	3.08	5.4	0.999	0.33	0.7	0.82
<i>Methocel® K4M/ Carbopol® 971P NF</i>										
<b>F9</b>	0.988	0.15	- 70.8	0.999	4.62	4.6	0.998	0.56	- 4.9	0.80
<b>F10</b>	0.991	0.12	- 81.0	0.994	3.58	4.1	0.999	0.90	1.2	0.69
<b>F11</b>	0.989	0.09	- 92.5	0.991	2.71	3.7	0.998	0.93	1.7	0.65
<b>F12</b>	0.990	0.13	- 77.5	0.998	4.06	4.3	0.999	0.73	- 1.0	0.74
<b>F13</b>	0.991	0.10	- 82.0	0.995	3.09	4.1	0.999	0.76	1.0	0.70
<b>F14</b>	0.989	0.08	- 91.6	0.984	2.49	3.6	0.994	1.00	2.3	0.63
<b>F15</b>	0.989	0.16	- 56.9	0.999	4.90	5.0	0.997	0.45	- 6.0	0.84
<b>F16</b>	0.995	0.12	- 61.8	0.992	3.59	4.7	0.998	0.66	1.8	0.74

Analiza mehanizma oslobađanja teofilina pokazuje da su dobijene  $n$  vrednosti difuzionog eksponenta manje ili jednake 0.88 (kod K100M/karbomer matriksa), odnosno manje od 0.74 (kod K4M/karbomer matriksa) tako da oba procesa i difuzija i erozija doprinose oslobađanju leka, što ukazuje na prisustvo anomalnog transporta (odnosno ne-Fickove difuzije). Porast udela karbomera u matriksima dovodi do smanjenja vrednosti  $n$  od 0.88 na 0.78 (kod Methocel® K100M / Carbopol® 971P NF), odnosno od 0.74 na 0.63 (kod Methocel® K4M / Carbopol® 971P NF).

Najveća  $n$  vrednost (više od 0.90) kod formulacije samo na bazi Methocel® K100M, ukazuje na prisustvo Case II transporta, kinetiku nultog reda. Kod analiziranih matriksa samo na bazi hidroksipropilmetilceluloze, dobijene  $n$  vrednosti pokazuju da je erozija predominantni mehanizam u oslobađanju teofilina. Nasuprot ovome, kada se karbomer dovede u kontakt sa medijumom, spolašnja površina matriks tablete počinje da

hidratiše, bubri i formira gel sloj (hidrogel), koji dalje kontroliše oslobađanje leka iz tableta. Pošto karbomer nije hidrosolubiln on se ne rastvara i erozija na način kao kod linearnih polimera se ne dešava. Kada hidrogel sloj postane potpuno hidratisan, osmotski pritisak unutar njega može rastaviti strukturu, putem odvajanja delova sa površine hidrogela (polimerna relaksacija). Kod matriksa koji predstavljaju kombinaciju HPMC i karbomera, mehanizam difuzije pokazuje veći uticaj na oslobađanje leka i stoga se javlja smanjenje  $n$  vrednosti, vodeći ka anomalnom transportu. Slični rezultati dobijeni su od strane Lubrizol, 2011c, za slučaj oslobađanja teofilina iz matriksa na bazi karbomera.

Korišćenjem linearnog modela kod statističke analize ANOVA, za dobijene vrednosti difuzionog eksponenta  $n$ , nađen je značajan uticaj udela karbomera u kombinaciji sa Methocel® K100M ( $p < 0.002$ ), odnosno sa Methocel® K4M ( $p < 0.0003$ ), na mehanizam oslobađanja teofilina.

#### 3.2.4.2.4. Analiza faktorskih efekata

Vrednosti  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_{12}$  odražavaju efekat nezavisno promenljivih  $X_1$  i  $X_2$  na zavisno promenljive (tabela 3.2.24, slika 3.2.6). Pozitivni znak ispred koeficijenta ukazuje na sinergistički uticaj, a veća apsolutna vrednost koeficijenta na veći uticaj nezavisno promenljive na zavisno promenljivu.

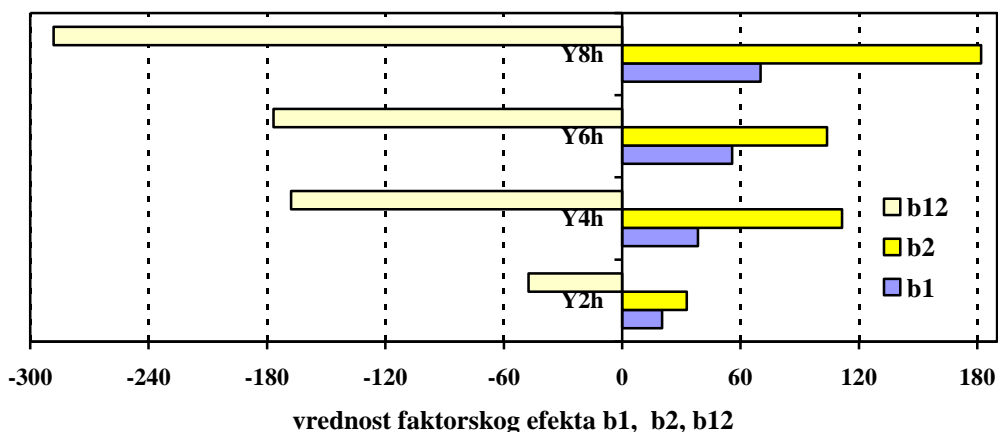
Tabela 3.2.24. Pregled statističkih parametara usvojenog optimalnog modela analize i izračunati koeficijenti uticaja nezavisno promenljivih

Matriks: Model:	Methocel® K100M / Carbopol 971P NF				Methocel® K4M / Carbopol 971P NF			
	<i>Kvadratni</i>				<i>Linearni</i>			
Parametri	$Y_{2h}$	$Y_{4h}$	$Y_{6h}$	$Y_{8h}$	$Y_{2h}$	$Y_{4h}$	$Y_{6h}$	$Y_{8h}$
<i>Sd</i>	0.34	0.66	0.69	1.59	1.05	1.82	1.56	1.48
<i>Adjusted R<sup>2</sup></i>	0.979	0.985	0.993	0.978	0.998	0.957	0.981	0.986
<i>Predicted R<sup>2</sup></i>	0.971	0.968	0.987	0.960	0.887	0.933	0.967	0.975
<i>PRESS</i>	1.1	6.5	6.7	32.1	12.8	36.3	29.2	27.3
$b_1 (X_1)$	20.2	38.4	55.7	70.1	28.6	49.6	67.5	80.8
$b_2 (X_2)$	32.7	111.4	103.9	181.9	-10.3	-37.1	-44.8	-45.0
$b_{12} (X_1 X_2)$	-47.5	-167.9	-176.8	-288.2	-	-	-	-

Kod HPMC K100M/karbomer matriksa vrednosti koeficijenta  $b_1$  su manje nego vrednosti  $b_2$  ukazujući da je uticaj K100M ( $X_1$ ) na oslobađanje leka u toku vremena



manji nego od strane karbomera ( $X_2$ ). Takođe uticaj K100M ( $X_1$ ) frakcije na količinu oslobođenog leka je veći ( $b_1$  vrednost 55.79 i 70.10) u kasnijim satima ispitivanja (6h, 8h), nego u ranijim satima oslobađanja leka (2h i 4h), što se može objasniti postignutom klompletnijom hidratacijom i nagrađnjom gel barijere u kasnijem periodu ispitivanja. Koeficijent  $b_2$  je značajno većih vrednosti u odnosu na  $b_1$ , tako da karbomer pokazuje značajno veći uticaj na oslobađanje leka u odnosu na hidroksipropilmetilcelulozu u toku celog intervala ispitivanja.



Slika 3.2.6. Vrednosti faktorskih efekata na odgovor  $Y_{2h}$ ,  $Y_{4h}$ ,  $Y_{6h}$ ,  $Y_{8h}$

Koeficijent  $b_{12}$  ima najveću vrednosti pokazujući da uticaj kombinacije HPMC K100M i karbomera ( $X_1$   $X_2$ ) predstavlja glavni faktor uticaja na oslobađanje leka iz matriks tabeta, a porast vrednosti faktora ukazuje na mnogo značajniji uticaj u kasnijoj fazi ispitivanja. Ovo se može objasniti pretpostavljenom snažnom sinergističkom interakcijom između dva gel sloja formirana od strane HPMC i karbomera. Značajan uticaj faktora  $X_1$   $X_2$  u kasnijoj fazi može se dovesti u vezu i sa sporijim gelirajućim svojstvima hidroksipropilmetilceluloze visokog viskoziteta na početku i naglim geliranjem karbomera samo pri višim pH vrednostima medijuma za rastvaranje (kasnija faza ispitivanja).

Udeo polimera u matriksu ima obrnuto srazmeran efekat na oslobađanje leka (negativan znak ispred  $b_{12}$ ). Najsporije oslobađanje leka dobijeno je za kombinaciju najmanjeg udela HPMC i najveće količine karbomera u ukupnom polimernom matriksu.

Za matrikse sa HPMC nižeg viskoziteta (K4M) i karbomerom, vrednosti koeficijenta  $b_1$  i  $b_2$  ukazuju da oba faktora imaju značajan uticaj na oslobađanje leka. Uticaj HPMC

K4M frakcije ( $X_1$ ) je veći ( $b_1$  vrednosti 67.5 i 80.8) u kasnijoj fazi ispitivanja (6h,8h) dok je uticaj frakcije karbomera ( $X_2$ ) na oslobađanje leka konstantne vrednosti u toku posmatranog perioda ispitivanja (-44.8 i -45.0). Udeo karbomer-a ( $X_2$ ) u matriksu ima obrnuto srazmeran uticaj na oslobađanje leka (negativan znak ispred  $b_2$ ). HPMC K4M kao polimer nižeg viskoziteta zahteva manje vreme za penetraciju vode, bubrenje i formiranje gel sloja tako da se uticaj ovog polimera na oslobađanje leka uočava ne samo u prvoj fazi ispitivanja već i u kasnijem periodu. Gel barijera koju gradi K4M ima manji viskozitet nego barijera K100M, te stoga pokazuje i manji uticaj na količinu oslobođenog leka u kasnijoj fazi ispitivanja. Karbomer gel sloj ima glavni uticaj u usporavanju oslobađanja leka iz K4M / karbomer matriksa. Sa povećanjem količine karbomera u matriksu, jači i uniformniji gel sloj se stvara dovodeći do većeg usporavanja oslobađanja leka.

Rezultati su pokazali da eksperimentalni dizajn smeše može biti uspešno primenjen u analizi uticaja, intragranularno (HPMC K100M i K4M viskoziteta) i ekstragranularno (karbomer) kombinovanih polimera, na oslobađanje teofilina iz tableta.

Usporeno oslobađanje teofilina iz matriks tableta u toku osam sati ispitivanja nađeno je kod svih ispitivanih formulacija. Veće usporavanje oslobađanja je kod matriksa na bazi karbomera u odnosu na matrikse izrađene samo od HPMC. Što je veći udeo karbomera sporija je brzina oslobađanja i manja vrednost difuzionog eksponenta  $n$  dobijena. Kod HPMC matriksa erozija je predominantni mehanizam oslobađanja (odnosno Case II transport) dok se sa inkorporiranjem karbomera javlja anomalni transport kod koga su i proces erozije i proces difuzije zastupljeni. Kod istog udela ekstragranularnog, a različitog viskoziteta intragranularnog polimera K100M ili K4M, uočava se sličnost profila formulacija, iskazana kroz faktor sličnosti, ukazujući na dominaciju uticaja karbomera u procesu oslobađanja.

### 3.2.5. Optimizacija formulacije matriks tableta primenom eksperimentalnog dizajna smeše i izbor prototip formulacije

#### 3.2.5.1. Metode

##### 3.2.5.1.1. Optimizacioni dizajn

Pomoću numeričke optimizacione procedure u okviru eksperimentalnog dizajna smeše moguće je, na osnovu postavljenog seta eksperimenata, sprovedene analize i utvrđenih odnosa, doći do optimalnog rešenja formulacije sa predloženim vrednostima za kritične attribute (udeo HPMC polimera i karbopola,  $X_1$  i  $X_2$ ) postizanja dinamike oslobađanja teofilina definisane kroz cilj optimizacije.

Optimalna formulacija do koje se želelo doći trebala je da pokaže profil oslobađanja sličan profilu nađenom kod ispitivanja odabranog komercijalnog preparata.

Pošto je prethodnim ispitivanjem obuhvaćeno pet komercijalnih preparata, pri čemu su dobijene potpuno različite brzine rastvaranja (tabela 3.1.13.), a pritom su to preparati sa tržišta potpuno ravnopravni u pogledu terapijske primene, za dalje analize odabrana su tri sa karakterističnim razlikama u dinamici oslobađanja (posle 8h oslobođeno oko 50 % za R-I, oko 80 % kod R-II i oko 63 % kod R-IV, tabela 3.1.4.). Tako da su na osnovu tri komercijalna proizvoda različitih brzina rastvaranja ispitivanih Testom 3 USP (tabela 3.1.4.), za potrebe sprovođenja optimizacije, definisana tri potencijalna opsega oslobađanja teofilina (posle 2h, 4h, 6h i 8h):

Potencijalni opseg koji odgovara profilu oslobađanja R-I, Aminofilin 350 mg

$Y_{2h}$	10% - 30%,	<i>ciljana vrednost 20 %</i> ,
$Y_{4h}$	20% - 40%	<i>ciljana vrednost 30 %</i> ,
$Y_{6h}$	30% - 50%,	<i>ciljana vrednost 40 %</i> ,
$Y_{8h}$	40% - 60%,	<i>ciljana vrednost 50 %</i> ,

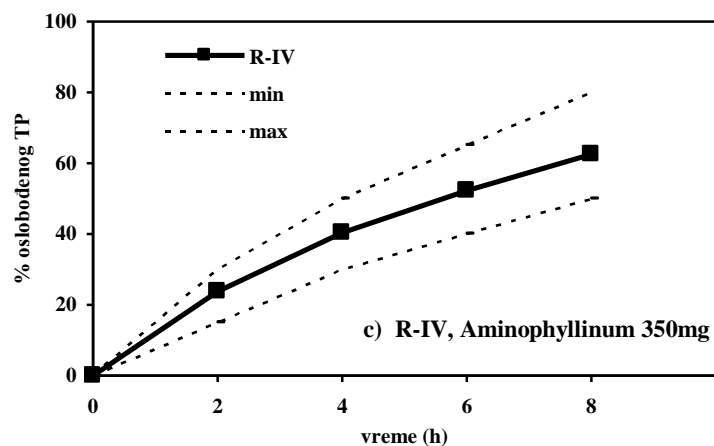
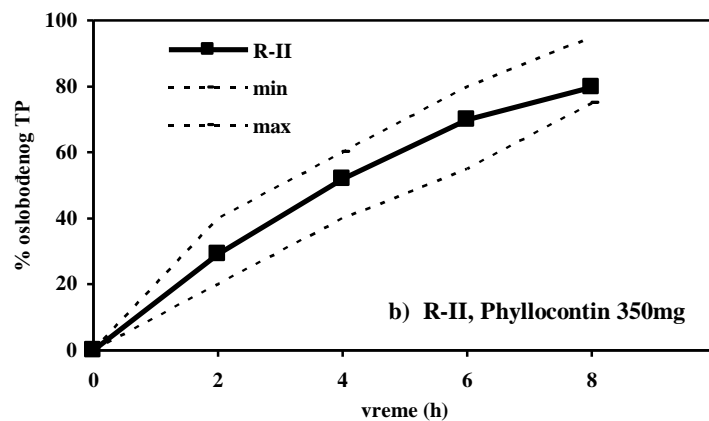
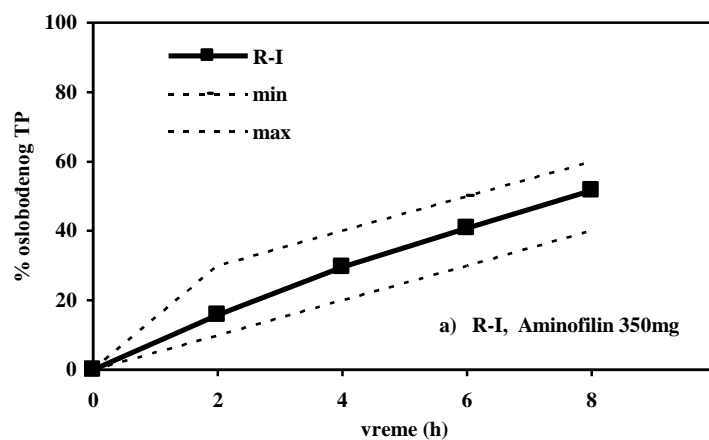
Potencijalni opseg koji odgovara profilu oslobađanja R-II, Phyllocontin 350 mg

$Y_{2h}$	20% - 40%,	<i>ciljana vrednost 30 %</i> ,
$Y_{4h}$	40% - 60%	<i>ciljana vrednost 50 %</i> ,
$Y_{6h}$	55% - 80%,	<i>ciljana vrednost 65 %</i> ,
$Y_{8h}$	75% - 95%,	<i>ciljana vrednost 85 %</i> ,

Potencijalni opseg koji odgovara profilu oslobađanja R-IV, Aminophyllinum 350 mg

$Y_{2h}$	15% - 30%,	<i>ciljana vrednost 25 %</i> ,
$Y_{4h}$	30% - 50%	<i>ciljana vrednost 40 %</i> ,
$Y_{6h}$	40% - 65%,	<i>ciljana vrednost 55 %</i> ,
$Y_{8h}$	50% - 80%,	<i>ciljana vrednost 70 %</i> ,

Potencijalni opsezi sa ciljanim vrednostima prikazani su grafički na slici 3.2.7.



Slika 3.2.7. Profili oslobađanja komercijalnih preparata ispitivanih Testom 3 USP, i postavljeni potencijalni opsezi oslobađanja za potrebe postupka optimizacije

Ustanovljeni opsezi su korišćeni u procesu optimizacije kako bi se predvidele optimalne formulacije. Dobijeni su predlozi za tri optimalne formulacije, na osnovu kojih su izrađene matriks tablete predloženog sastava i ispitane. Radi procene uspešnosti optimizacije, upoređene su predviđene i nađene vrednosti zavisno promenljivih i izračunata je greška predviđanja prema jednačini 19:

$$PE \% = (O - P)/P \times 100 \quad (19)$$

PE % - Greška predviđanja (%); O – nađena vrednost; P - Predviđena vrednost

### 3.2.5.2. Rezultati i diskusija

Predviđeni i nađeni profili za predložene kombinacije dobijeni pomoću numeričke optimizacione procedure prikazani su u tabeli 3.2.25.

Tabela 3.2.25. Predviđene i nađene vrednosti zavisno promenljivih (količina oslobođenog leka u %) optimizovanih formulacija sa modifikovanim oslobađanjem

	$Y_{2h}$	$Y_{4h}$	$Y_{6h}$	$Y_{8h}$
<b>Profil oslobađanja po modelu R-I</b>				
<i>Predviđeno (<math>P_1</math>)</i>	19.00 %	28.59 %	40.00 %	50.00 %
<i>Nađeno (<math>O_1</math>)</i>	17.10 %	31.40 %	42.97 %	53.92 %
<i>Greška predviđanja</i>	-10.0 %	9.8 %	7.4 %	7.0 %
<b>Profil oslobađanja po modelu R-II</b>				
<i>Predviđeno (<math>P_2</math>)</i>	29.00 %	49.64 %	67.71 %	80.90 %
<i>Nađeno (<math>O_2</math>)</i>	26.43 %	53.87 %	72.02 %	85.82 %
<i>Greška predviđanja</i>	-8.9 %	8.5 %	6.4 %	6.1 %
<b>Profil oslobađanja po modelu R-IV</b>				
<i>Predviđeno (<math>P_3</math>)</i>	20.25 %	38.37 %	55.72 %	70.00 %
<i>Nađeno (<math>O_3</math>)</i>	22.10 %	41.03 %	60.64 %	72.90 %
<i>Greška predviđanja</i>	9.1 %	6.9 %	8.8 %	4.1 %

U slučaju komercijalnog preparata R-I Aminofilin 350 mg, optimizacionom procedurom predložena je kombinacija od 0.75/0.25 delova polimera, što odgovara kombinaciji datoj kod formulacija F11 ili F14 (K4M / karbomer: 60.0 mg/20.0.mg).

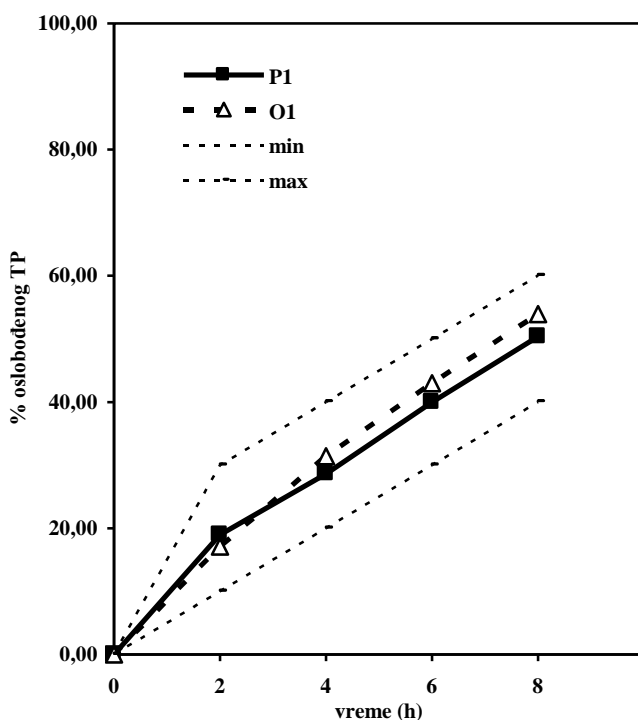
Za komercijalni preparat R-II Phyllocontin 350 mg, optimizacijom predložen udeo iznosio je 1.0/0.0 delova polimera, što odgovara kombinaciji datoj kod formulacija F9 ili F15 (K4M / karbomer: 80.0 mg/0.0.mg).

Profil sličan komercijalnom preparatu R-IV Aminophyllinum 350 mg, mogao se postići za predloženi optimizovani odnos od 0.999 delova K100M, što je vrlo blisko kombinaciji datoj kod formulacije F1 ili F7 (K100M/karbomer, 80.0 mg/0.0mg).

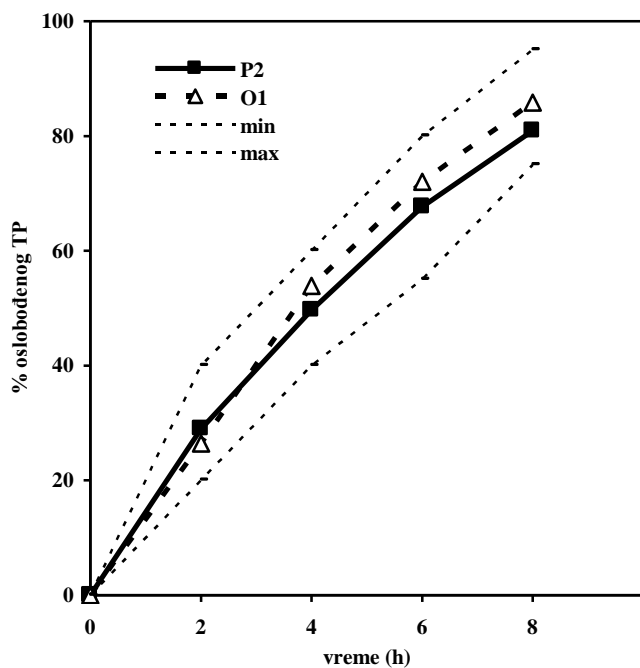
Rezultati brzine rastvaranja optimizovanih tableta kao i vrednosti predviđene optimizacionom procedurom su prikazani u tabeli 3.2.25. i na slici 3.2.8. – 3.2.10.

Izračunate greške predviđanja za Y2h, Y4h, Y6h i Y8h, za model formulacije u odnosu na referentne proizvode bila je ispod 10 %.

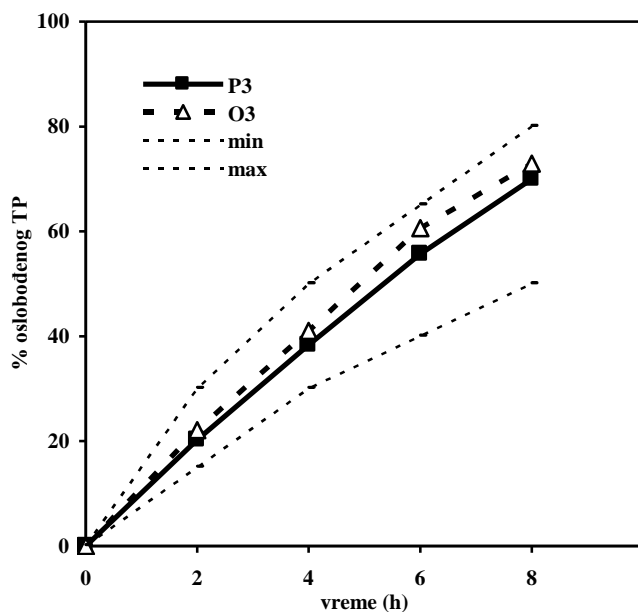
Podaci iz literature sadrže navode o korišćenju sličnog eksperimentalnog modela dizajna u svrhu dobijanja optimalne formulacije predefinisanih atributa kvaliteta (Huang i sar., 2005; Chopra i sar., 2007; ).



Slika 3.2.8. Predviđeni (P1) i nađeni (O1) profili brzine rastvaranja za optimizovanu formulaciju za profil oslobađanja prema modelu R-I



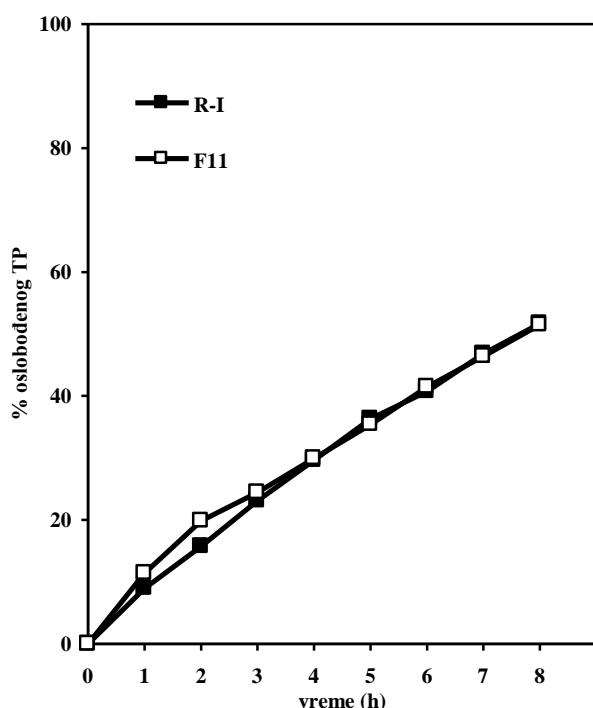
Slika 3.2.9. Predviđeni (P2) i nađeni (O2) profili brzine rastvaranja za optimizovanu formulaciju za profil oslobađanja prema modelu R-II



Slika 3.2.10. Predviđeni (P3) i nađeni (O3) profili brzine rastvaranja za optimizovanu formulaciju za profil oslobađanja prema modelu R-IV

### 3.2.5.2.1. Poređenje profila i izbor prototip formulacije

Obzirom da neke formulacije unutar postavljenih setova eksperimenata po sastavu i odnosu nezavisno promenljivih odgovaraju optimizovanim formulacijama, urađeno je poređenje njihovih profila u odnosu na profil komercijalnog preparata (slika 3.2.11-3.2.13.), i na osnovu toga utvrđene prototip formulacije za dalji rad.

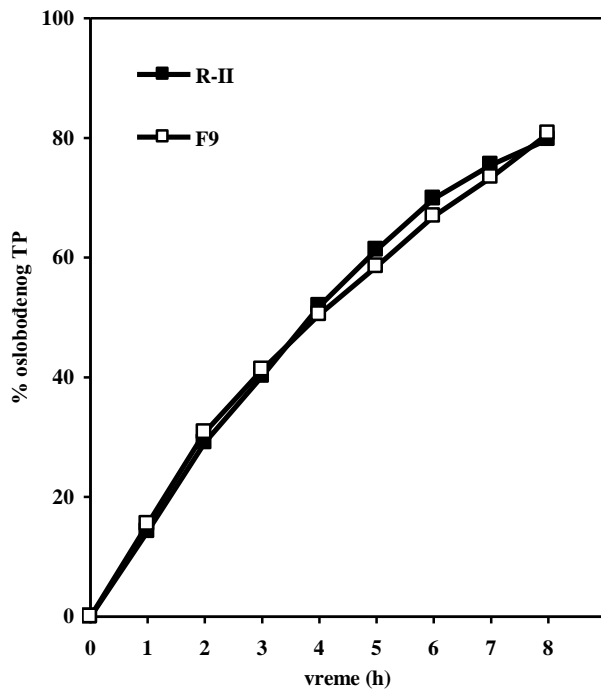


Slika 3.2.11 Poređenje profila brzine rastvaranja Aminofilin 350 mg (R-I) i formulacije F11 sa optimizacijom definisanim udelom Methocel® K4M/Carbopol® (60/20)

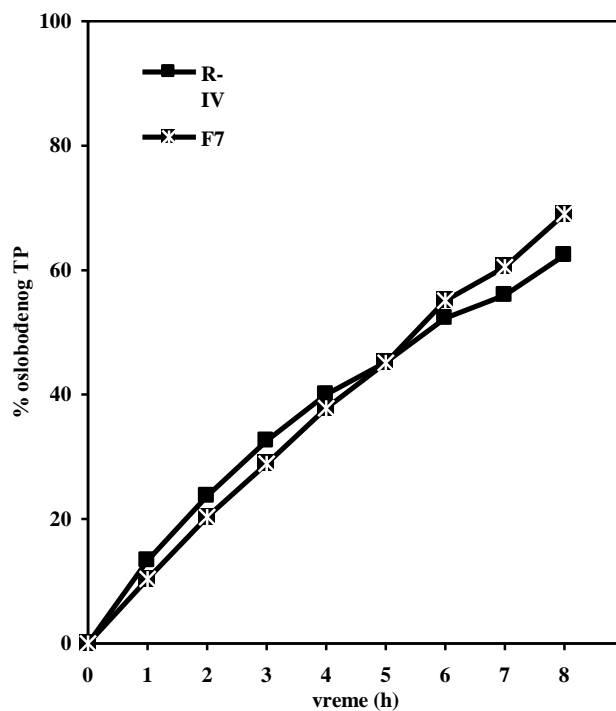
Za komercijalni preparat R-I, Aminofilin 350 mg, izdvojena je optimalna prototip formulacija F11 sa udelom Methocel® K4M/Carbopol 971P NF 60/20, koja je pokazala najprihvatljiviju sličnost profila ( $f_1=4.1$ ,  $f_2=84.2$ ).

U slučaju komercijalnog preparata R-II, Phyllocontin 350 mg, F9 formulacija sa udelom Methocel® K4M/Carbopol 971P NF 80/0, koja je pokazala najprihvatljiviju sličnost profila ( $f_1=3.3$ ,  $f_2=83.4$ ) je odabrana.





Slika 5.12. Poređenje profila brzine rastvaranja Phyllocontin 350 mg (R-II) i formulacije F9 sa optimizacijom definisanim udelom Methocel® K4M/Carbopol® (80/0)



Slika 3.2.13. Poređenje profila brzine rastvaranja Aminophyllinum 350 mg (R-IV) i formulacija F7 sa optimizacijom definisanim udelom Methocel® K100M/Carbopol® (80/0)

Za komercijalni preparat R-IV, Aminophyllinum 350 mg, izdvojena je optimalna prototip formulacija F7 sa udelom Methocel® K100M/Carbopol® 80/0, koja je pokazala najprihvatljiviju sličnost profila ( $f_1=8.1$ ,  $f_2=70.7$ ).

Optimalna formulacija do koje se želelo doći trebala je da pokaže profil oslobađanja sličan profilu nađenom pri ispitivanju odabranog komercijalnog preparata. Numerička optimizaciona procedura mešanog eksperimentalnog dizajna omogućila je dobijanje tri optimalna rešenja uz izračunatu grešku predviđanja ispod 10 %, i konkretne sastave formulacija sa optimizovanim udelima polimera i brzinama oslobađanja sličnim u odnosu na tri različita profila nađena kod komercijalnih preparata uzetih u razmatranje. Rezultati su u skladu sa navodima literature o korišćenju sličnog eksperimentalnog modela dizajna u svrhu dobijanja optimalne formulacije predefinisanih atributa kvaliteta (Huang i sar., 2005; Chopra i sar., 2007). Za komercijalni preparat R-I, Aminofilin 350 mg, izdvojena je optimalna prototip formulacija F11 sa udelom Methocel® K4M/Carbopol®, 60/20, za preparat R-II, Phyllocontin 350 mg, F9 formulacija sa udelom Methocel® K4M/Carbopol® 80/0, i za komercijalni preparat R-IV, Aminophyllinum 350 mg, F7 sa udelom Methocel® K100M/Carbopol® 80/0.

### 3.3. ISPITIVANJE *IN VITRO* / *IN VIVO* ODNOSA

Ispitivanja prikazana u ovom delu odnose se na analizu mogućnosti uspostavljanja preliminarnog *in vitro/in vivo* odnosa<sup>(1)</sup>, kod izdvojene tri prototip formulacije i odabrana dva komercijalna proizvoda kao i proveru opravdanosti primene kunića kao životinjskog modela za *in vivo* ispitivanja u ranoj fazi razvoja.

#### 3.3.1. Materijali i metode

##### 3.3.1.1. Materijali

U *in vivo* ispitivanja su uključena dva od razmatrana tri (odjeljak 3.2.5.) komercijalna preparata u obliku tableta sa modifikovanim oslobađanjem (koji su pokazivali granične minimalne/maksimalne vrednosti oslobađanja *in vitro* u toku 8h ispitivanja od oko 50 % odnosno 80% leka) i tri optimizovane prototip formulacije odabrane *in vitro* ispitivanjima opisanim u odeljku 3.2.5.2.1:

- **Aminofilin tablete** sa produženim oslobađanjem 350 mg, Srbolek ad, Srbija, **R-I**,
- **Phyllocontin®-350**, tablete Purdue Pharma, Kanada, **R-II**,
- Formulacija F11 (odjeljak 3.2.5.2.1) sa udelom Methocel® K4M/Carbopol 971P NF 60/20, u daljim analizama označena kao **Prototip formulacija PF-I**,
- Formulacija F7 (odjeljak 3.2.5.2.1) sa udelom Methocel® K100M/Carbopol 971P NF 80/0, u daljim analizama označena kao **Prototip formulacija PF-II**,
- Formulacija F9 (odjeljak 3.2.5.2.1) sa udelom Methocel® K4M/Carbopol 971P NF 80/0, u daljim analizama označena kao **Prototip formulacija PF-III**,

---

<sup>(1)</sup> - Metodologija i izvođenje *in vivo* ispitivanja na kunićima kao životinjskim modelima bila je predmet druge doktorske disertacije (Petričević, 2010) a nađene koncentracije teofilina u krvi kunića preuzete su iz disertacije za potrebe analize mogućnosti uspostavljanja *in vitro/in vivo* odnosa.

### 3.3.1.2. Metode

**In vitro ispitivanja** sprovedena su prema Testu 3 USP (odjeljak 3.1.): aparatura II USP, brzina mešanja 50 rpm, na temperaturi  $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 900 ml medijuma (veštački želudačni sok bez pepsina, pH=1.2/0-1h, veštački crevni sok bez enzima, pH=7.5/2h-8h), a sadržaj oslobođenog teofilina je određen UV-VIS spektrofotometrijskom metodom na 271 nm.

**In vivo ispitivanja** (doktorska disertacija Petričević, 2010), sprovedena su na četiri kunića (rase Chinchilla), mase 4.0-4.5kg, metodom unakrsnog jednodoznog ispitivanja. Između primene dva preparata poštovan je "washout" period od sedam dana. Životinje nisu dobijale nikakve druge lekove, čuvane su u odvojenim kavezima a njihov tretman sproveden je u skladu sa važećim evropskim vodičem *Guide for Care and Use of Laboratory Animals*, NIH publication No 85-23. Svakoj životinji aplikovana je jedna tableta, koja je odgovarala humanoj dozi teofilina (283,5 mg kod preparata R-II odnosno 300 mg anhidrovanog teofilina kod svih ostalih tableta). Uzorci krvi životinja uzimani su iz ušne vene životinja prema protokolu (Donovan i Brown, 2006), u definisanim vremenskim intervalima, u periodu 0-48h koji odgovara četvorostrukom poluživotu eliminacije "*half-life*" (5-13h) kod teofilina. Plazma koncentracija teofilina određivana je posebnom za ova ispitivanja razvijenom HPLC metodom, na talasnoj dužini 254 nm.

### 3.3.1.3. Analiza *in vitro* i *in vivo* rezultata

Pri obradi *in vitro* rezultata, primenjeni su matematički modeli za procenu profila brzine rastvaranja teofilina (opisani u okviru poglavlja 3.1.1 i 3.2.1.), i određeni su faktor sličnosti  $f_2$ , konstante brzine oslobađanja ( $k_0$ ,  $k_2$ ,  $k_p$ ), *Lag/Burst* efekat i difuzioni eksponent  $n$ .

Pri analizi *in vivo* rezultata razmatrani su:  $C_{max}$ , maksimalna plazma koncentracija koja predstavlja najvišu koncentraciju leka postignutu u plazmi kunića posle oralne aplikacije;  $T_{max}$ , vreme potrebno da se dostigne maksimalna koncentracija leka u plazmi.

Površine ispod krive plazma koncentracije leka u funkciji vremena ( $AUC_{0 \rightarrow t}$  i  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ ), koje su izračunavane primenom trapezoidalnog metoda, a prema jednačini 20, (Cardot, 2007a; Bendas, 2009; Delvadia i sar., 2012 ):

$$AUC_{0 \rightarrow \infty} = \Sigma[(C_i + C_{i+1}/2) (t_{i+1} - t_i)] + C_n / K_{el} \quad (20)$$

Bioraspoloživost jednog proizvoda bliže određuje količinu i brzinu kojom lek dospeva u cirkulaciju (Bourne, 2006; Ikegami i sar., 2006). Izračunavana je relativna biološka raspoloživost ( $F_{rel} \%$ ) kako bi se uporedila raspoloživost prototip formulacija različitih sastava na bazi iste aktivne supstance, a u odnosu na komercijalne preparate koji su tretirani kao standardni dozirani oblik, a prema jednačini 21. Pošto su poređeni preparati različitih deklariranih doza aminofilina, izračunavanje je dozno normalizovano; odnosno vrednosti površine ispod krive  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  su korigovane veličinom aplikovane doze:

$$F_{rel} \% = ([AUC_{0 \rightarrow \infty}]_{Test} \times Dose_{Ref}) / ([AUC_{0 \rightarrow \infty}]_{Ref} \times Dose_{Test}) \times 100 \quad (21)$$

Za određivanje *in vivo* profila rastvaranja i resorpcije leka, izračunavan je procenat kumulativne frakcije ( $\% FD_t$ ) resorbovane doze teofilina u vremenu t primenom Wagner-Nelson-ove jednačine (Wagner i Nelson, 1964; Cardot, 2007; Shah i sar. 2009). Ova metoda izračunavanja primenljiva je kod aktivnih supstanci čija se raspodela u organizmu može opisati jednodimenzionalnim farmakokinetičkim modelom, gde spada i teofilin, i u literaturi se sreće kod *in vitro/in vivo* analiza preparata teofilina na kunićima (El-Yazigi i Sawchuk, 1981; El-Yazigi i Sawchuk, 1985; Musko i sar., 2001), psima (Tse i Szeto, 1982; Ikegami i sar., 2006) i ljudima (Torrent i sar., 1988; Sabnis i Adeyeye., 1998; Varshosaz i sar., 2000):

$$\% FD_t = (C_t + K_{el} \times AUC_{0 \rightarrow t}) / K_{el} \times AUC_{0 \rightarrow \infty} \quad (22)$$

$\% FD_t$ , - frakcija resorbovanog leka u vremenu t;  $C_t$ , - koncentracija leka u plazmi u vremenu t;  $K_{el}$ , - konstanta brzine eliminacije.

Izračunati *in vivo* profili resorbovane frakcije teofilina su grafički poređeni sa eksperimentalno nađenim *in vitro* profilima brzine rastvaranja (Shah i sar., 2009), uz

primenu regresione analize, i na osnovu koeficijenta korelacije, koeficijenta pravca prave i odsečka na y-osi, procenjavano je postojanje *in vitro/in vivo* korelacije nivoa A. Prema zahtevima regulative očekuje se uspostavljanje linearne zavisnosti (CDER, 1997; Emami, 2006; Nandy i sar., 2011; Mirza i sar., 2013), mada su i nelinearni odnosi poznati i prihvatljivi (Polli i sar., 1996; Hayes i sar., 2004; Parojčić i sar., 2007).

Predvidivost primenjenog *in vitro/in vivo* modela i primenjenog *in vitro* testa brzine rastvaranja, procenjena je na osnovu izračunatog procenta greške predviđanja (PE%), dobijenog poređenjem predviđenih i eksperimentalno dobijenih farmakokinetičkih parametara ( $C_{8h}$  i  $AUC_{0\rightarrow 8h}$ ) kod kunića. Pretpostavljeni farmakokinetički parametri su izračunavani iz plazma koncentracionih profila, dobijenih izračunavanjem iz eksperimentalno nađenih *in vitro* profila brzine rastvaranja primenom inverzne Wagner-Nelson-ove jednačine (23), predložene od strane Gohel i sar., 2005 i primenjene u radovima drugih autora (Bendas, 2009; Scheubel, 2010; Delvadia i sar., 2012):

$$C_{t+1} = (2 \cdot \Delta F \cdot D / V_d) + C_t (2 - K_{el} \cdot \Delta t) / (2 + K_{el} \cdot \Delta t) \quad (23)$$

$C_{t+1}$ , - predviđena koncentracija leka u plazmi u vremenu  $t+1$ ;  $\Delta F = Fa_{(t+1)} - Fa_{(t)}$ ;  
 $D$ , - doza;  $V_d$ , - volumen distribucije;  $K_{el}$ , - konstanta brzine eliminacije;  $\Delta t = t_{(t+1)} - t_t$ .

Do vrednosti veličina  $V_d$  i  $K_{el}$  upotrebljenih u izračunavanjima inverznom Wagner-Nelsonovom jednačinom došlo se na osnovu raspoloživih rezultata i odgovarajućih preračuna. Postojanje inter i intra individualnih razlika u vrednosti konstante brzine eliminacije teofilina (Wagner, 1986; Milavetz i sar., 1987) konstatovano je, pri ispitivanju na ljudima (Aronson i sar., 1992), kunićima (El-Yazigi i Sawchuk, 1981), pri različitom načinu aplikacije (i.v. vs oralni put), kao i kod različitog sastava (sa trenutnim oslobađanjem vs sa produženim oslobađanjem), farmaceutskog oblika (Aronson i sar., 1992; Gohel i sar., 1997; Varshosaz i sar., 2000). Stoga su vrednosti volumena distribucije  $V_d$  i konstante brzine eliminacije  $K_{el}$  koje su korišćene u izračunavanjima inverznom Wagner-Nelson-ovom jednačinom, preuzete iz EMA, 1998, izveštaja komiteta za veterinarske medicinske proizvode (dobijene posle jednokratne aplikacije teofilina i.v. injekcijom kod kunića): prividni volumen distribucije 545 ml/kg a ukupni klirens 69 ml/kg/h. Dodatno, prividni volumen distribucije korigovan je u odnosu na primenjenu dozu. Kod jednodimenzionalnog modela pri aplikaciji i.v. injekcije faktor proporcionalnosti između doze  $D$  (10 mg) i  $V_d$  kod kunića je iskazan odnosom

$D/V_d$ . Ova proporcionalnost je korišćena u izračunavanjima prividnog volumena distribucije kod zečeva za primenjene doze od 283.5 mg i 300 mg teofilina. Opisanim postupkom izračunate vrednosti prividnog volumena distribucije su iznosile 16.3 L ili 15.4 L. Konstanta brzine eliminacije  $K_{el}$  računata je kao  $Cl_{total}/V_d$  i dobijena vrednost 0.126 L/h je korišćena u izračunavanjima u okviru inverzne Wagner-Nelson-ove jednačine.

Procenat greške predviđanja (%PE), je računat na osnovu jednačine (24):

$$\%PE = (\text{dobijena vrednost} - \text{predviđena vrednost}) / \text{dobijena vrednost} \times 100 \dots \dots \dots (24)$$

Greška predviđanja ne veća od 15% (CDER, 1997; Bendas, 2009; Delvadia i sar., 2012) ukazuje da je korelacioni model za predviđanje prihvatljiv, a korišćeni *in vitro* test primenljiv u predviđanjima *in vivo* ponašanja.

### 3.3.2. Rezultati i diskusija

#### 3.3.2.1. Analiza *in vitro* rezultata

Za formulacije uključene u *in vivo* ispitivanja: tri prototip formulacije sa modifikovanim oslobađanjem PF-I, PF-II, PF-III, (izvorni rezultati prikazani u tabelama 3.2.19 i 3.2.20) i dva komercijalna proizvoda R-I, R-II (izvorni rezultati prikazani u tabeli 3.1.4), sumirani rezultati *in vitro* brzina rastvaranja dati su tabelom 3.3.1 i grafički na slici 3.3.1.

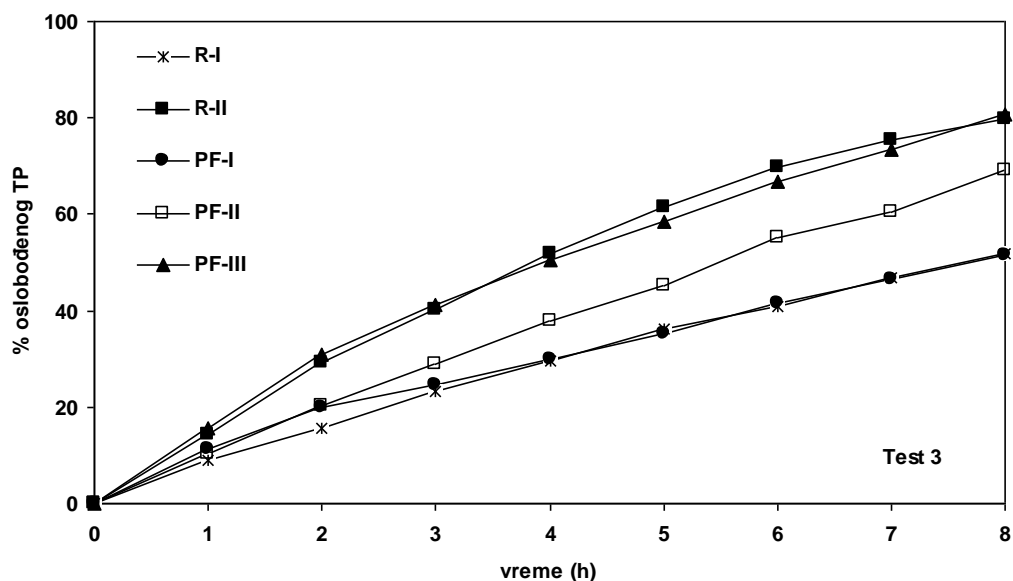
Kao što je već navedeno u odeljku 3.2.5.2.1. odabrane prototip formulacije su različitih sastava i brzina oslobađanja, pošto su njihovi profili optimizovani u odnosu na tri različita komercijalna proizvoda, pa su razlike izračunatih vrednosti faktora sličnosti (tabela 3.3.2) dobijene: PF-I/PF-II ( $f_2=48.9$ ), PF-II/PF-III ( $f_2=46.8$ ) i PF-III/PF-I ( $f_2=33.6$ ). Kako je optimizacionom procedurom i postavljeno slični profili oslobađanja su kod R-I/PF-I ( $f_2=84.1$ ) i R-II/PF-III ( $f_2=83.4$ ) dok je profil formulacije PF-II u poređenju sa referentnim bio različit. Prema količinama oslobođenog teofilina u toku vremena, redosled dinamike oslobađanja iz preparata uključenih u *in vivo* studiju, može se rangirati:

$$PF-I_{(HPMC\ K4M / carbomer)} \approx R-I \neq PF-II_{(HPMC\ K100M)} \text{ i } PF-III_{(HPMC\ K4M)} \approx R-II.$$

Tabela 3.3.1. Brzine rastvaranja teofilina, kod prototip formulacija (PF-I, PF-II, PF-III) i komercijalnih preparata (R-I i R-II) uključenih u *in vivo* ispitivanja

<b>Test 3</b> vreme (h)	<b>R-I</b>		<b>R-II</b>		<b>PF-I</b>		<b>PF-II</b>		<b>PF-III</b>	
	%	<i>Sd</i>	%	<i>Sd</i>	%	<i>Sd</i>	%	<i>Sd</i>	%	<i>Sd</i>
1	8.9	0.41	14.2	0.68	11.4	0.58	10.4	0.58	15.5	0.57
2	15.7	0.33	29.1	0.51	19.9	0.56	20.3	0.56	30.8	0.78
3	23.1	0.72	40.2	1.29	24.4	1.01	28.9	1.01	41.0	1.80
4	29.6	1.23	51.9	1.32	29.9	0.26	37.8	0.26	50.6	1.22
5	36.3	1.39	61.3	2.53	35.4	1.40	45.1	1.40	58.5	1.54
6	40.7	2.00	69.8	1.74	41.4	0.34	55.2	0.34	66.9	3.34
7	46.8	1.89	75.5	2.38	46.4	1.50	60.5	1.50	73.4	1.62
8	51.7	2.82	79.8	1.60	51.5	0.20	69.0	0.20	80.7	4.37





Slika 3.3.1. Profili brzine oslobađanja teofilina za prototip formulacije (PF-I do PF-III) i komercijalne preparate (R-I i R-II) uključene u *in vivo* ispitivanja

Tabela 3.3.2. Vrednosti faktora sličnosti za profile tableta (PF-I, PF-II, PF-III i R-I i R-II) uključenih u *in vivo* ispitivanja

Test	R-I / R-II	R-I / PF-I	R-I / PF-II	R-I / PF-III	R-II / PF-I	R-II / PF-II	R-II / PF-III	PF-I / PF-II	PF-II / PF-III	PF-III / PF-I	
3	f2	32,3	84,1	48,6	33,2	32,6	45,2	83,4	48,9	46,8	33,6

Vrlo sličan profil oslobađanja našli su Möller i Langenbuher, 1982, kod PhylloTemp retard 225 mg: 1h: 19 %, 4h: 55 %, 6h: 68 % i 8h: 80 % pri korišćenju iste aparature II (rotirajuće lopatice), pri nešto većoj brzini od 100rpm i slične kombinacije i dinamike zamene medijuma 0.1N HCl/0-1h, pH=6.8 /fosfatni pufer 2-8h.

Konstante brzine oslobađanja (tabela 3.3.3) ispitivanih formulacija bile su u saglasnosti sa uočenom dinamikom oslobađanja. Najmanja brzina oslobađanja kinetikom nultog reda ili kvadratnog korena nađena je kod formulacije PF-I sa Methocel® K4M/Carbopol®971P NF i komercijalnog proizvoda R-I; veća brzina oslobađanja izračunata je kod PF-II (sa Methocel® K100M), a najbrže oslobađanje je kod PF-III (sa Methocel® K4M) i komercijalnog preparata R-II sa cetostearilalkoholom i etilcelulozom (<http://www.rxmed.co/pharmaceutical>).

Izračunata vrednost difuzionog eksponenta  $n$  iznosila je 0.71 (za Methocel® K4M matriks, PF-III) što je u saglasnosti sa literaturom za HPMC K4M matrikse na bazi rastvorne lekovite supstance  $n=0.61-0.70$  (Perez-Marcos i sar., 1994),  $n=0.68-0.78$  (Kiortsis i sar., 2005), odnosno u slučaju HPMC K4M matriksa sa inkorporiranim teofilinom  $n=0.69-0.72$  (Rinaki i sar., 2003).

Kod Methocel® K100M matriksa, (PF-II) nađeno  $n=0.90$  ukazuje na prisutan Case II transport i eroziju (relaksaciju) kao primarni mehanizam oslobađanja teofilina, dok se u literaturi sreće anomalni transport ( $0.45 < n < 0.89$ ) kao vid oslobađanja nerastvornih (Pradhan i sar., 2008), odnosno rastvornih (Modi i sar., 2010) aktivnih supstanci iz HPMC K100M matriksa.

Tabela 3.3.3. Kinetički parametri: konstanta brzine oslobađanja nultog reda  $k_0$ , kvadratnog korena  $k_2$  i Korsmayer-Peppasovim modelom  $k_p$ , difuzioni eksponent  $n$ , koeficijent korelacije  $r^2$  i *Lag/Burst* efekat

Run	Nultog reda			Higuchi model			Peppasov model			
	$r$	$k_0$ (min <sup>-1</sup> )	Lag/Burst (min)	$r$	$k_2$ (min <sup>-0.5</sup> )	Lag/Burst (min)	$r$	$k_p$ (min <sup>-n</sup> )	Lag/Burst (min)	$n$
<b>PF-I</b>	0.996	0.09	7.4	0.996	2.81	-11.8	0.999	0.63	-0.4	0.62
<b>PF-II</b>	0.997	0.13	3.5	0.997	4.16	-24.8	0.995	0.26	0.6	0.90
<b>PF-III</b>	0.995	0.15	11.8	0.996	4.66	-19.8	0.996	0.67	2.4	0.71
<b>R-I</b>	0.996	0.10	4.1	0.996	3.08	-17.0	0.999	0.29	0.4	0.27
<b>R-II</b>	0.985	0.16	10.5	0.998	4.79	-22.8	0.995	0.48	3.6	0.42

Kod matriksa (Methocel® K4M /Carbomer 971P NF, PF-I), dobijeno  $n=0.62$ , ukazuje da i proces difuzije i proces erozije učestvuju u oslobađanju leka i prisutan anomalni (ne-Fickian) transport. Rezultati su vrlo slični literaturno nađenim  $n=0.67$ , kod HPMC K4M/Carbopol 974 matriksa, primenjenog u količini (oko 90mg) i odnosu (3:1), slično našoj formulaciji PF-I (Perez-Marcos i sar., 1994). Uticaj prisutne hidroksipropilmetilceluloze se ogleda u smislu pomeranja mehanizma oslobađanja ka anomalnom, jer sami karbomer matriksi pokazuju difuziju  $n=0.45$  kod lako rastvornih (Lubrizol, 2011a) odnosno super Case II transport  $n > 0.89$  kod teže rastvornih supstanci (Parojčić i sar., 2004; Lubrizol, 2011a).

Kod komercijalnog preparata R-II sličnog po profilu oslobađanja PF-III, nađena vrednost  $n=0.42$  je u skladu sa literaturnim nalazima kod matriksa sa cetostearil alkoholom (Quadri i sar., 2003; Islam i sar., 2010). Matriksi ovog tipa, grade hidrofobne porozne sisteme (Puchun i sar., 2005) nerastvorne u vodi, bez mogućnosti bubrenja ili

rastvaranja, pa se oslobađanje leka odvija samo difuzijom, odnosno Fickian kinetikom (Wong i sar., 1992).

Najniže  $n=0.27$  kod komercijalnog proizvoda R-I, ukazuje na mehanizam oslobađanja teofilina, kvazi-difuzijom, a u literaturi ovako niske vrednosti difuzionog eksponenta su konstatovane kod kombinacija HPMC K100M i ksantan gume  $n = 0.32-0.41$  (Modi i sar., 2010), odnosno kod tableta diltiazem hidrohlorida sa HPMC K15M polimerom  $n=0.21-0.36$  (Bendas, 2009).

Efekat naglog oslobađanja (*Burst* efekat), prema Higuchi modelu se uočava kod svih ispitivanih formulacija, a može biti objašnjen sporijim formiranjem gel barijere.

Dobijeni rezultati ukazuju da se sa variranjem sastav formulacije i tipa polimera menja mehanizam i brzina oslobađanja leka, i da su shodno tome razlike u *in vivo* ponašanju očekivane, posebno u slučaju formulacija sa izrazitim razlikama u vrednosti  $n$  kao što su R-I, R-II (Munday i Fassihi, 1995; Mirza i sar., 2013).

### 3.3.2.2. Analiza i poređenje farmakokinetičkih parametara

Srednje plazma koncentracije teofilina kod ispitivanih tableta prikazane su na slici 3.3.2 i u tabeli 3.3.4 a pregled farmakokinetičkih parametara u tabeli 3.3.5.

*In vivo* profili pokazuju da je postignuto produženo oslobađanje i resorpcija teofilina kod kunića posle aplikacije svih formulacija, a vreme za postizanje maksimalne koncentracije leka u plazmi ( $T_{max}$ ) iznosilo je od 6.5h do 15.0h.

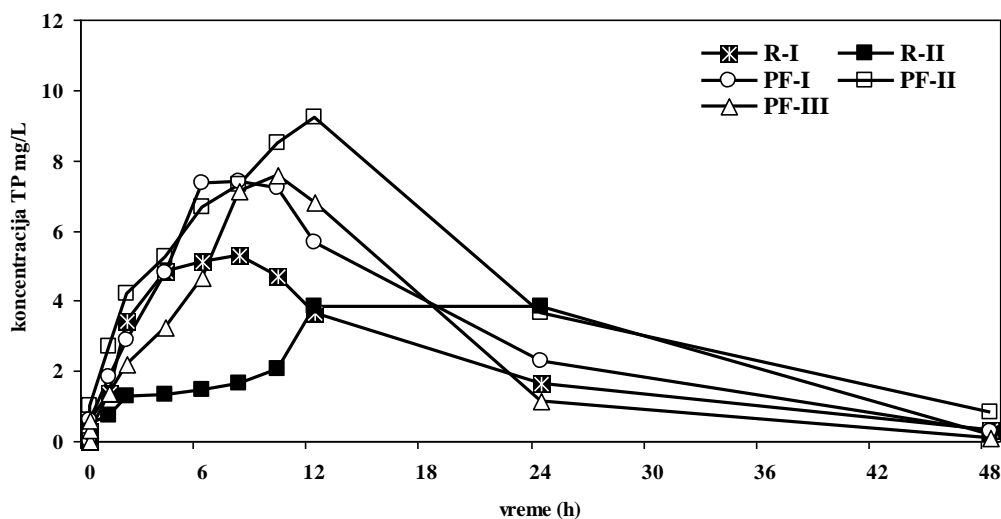
Duže vreme (tabela 3.3.5) za dostizanje maksimalne plazma koncentracije nađeno je kod kunića posle aplikacije PF-II (12.0h) i PF-III (10.5h), a nešto kraće vreme kod PF-I, (7.5h) i komercijalnog proizvoda R-I (6.50h). Proizvod R-II pokazao je najduže vreme (15.0h) za postizanje maksimalne koncentracije leka u plazmi u poređenju sa svim ostalim formulacijama.

Najviša vrednost  $C_{max}$  nađena je kod PF-II (9.2 mg/L), a slične ali niže vrednosti dobijene su kod druge dve prototip formulacije. Kod komercijalnih proizvoda maksimalna koncentracija u plazmi R-I (5.58 mg/L) i R-II (4.18 mg/L) bila je slične ali niže vrednosti u poređenju sa formulacijama PF-I (7.61 mg/L) i PF-III (7.84 mg/L).

$AUC_{0 \rightarrow 48h}$ , površina ispod krive plazma koncentracije u funkciji vremena, opisuje stepen apsorpcije u toku 48h i bila je najveće vrednosti kod PF-II (204.06 mg h/L), nešto niža kod PF-I (143.66 mg h/L), dok je za PF-III (115.90 mg h/L), R-II (113.25 mg h/L) i R-I (105.33 mg h/L) bila sličnih ali nižih vrednosti.

Na osnovu rezultata proističe da je najveća resorpcija zapažena kod PF-II i PF-I.

Sve prototip formulacije su pokazale dobru raspoloživost teofilina u sistemskoj cirkulaciji kunića u poređenju sa komercijalnim proizvodima a dobijene relativne biološke raspoloživost teofilina su većih vrednosti kod prototip formulacija PF-I, PF-II, PF-III (tabela 3.3.5) u poređenju sa R-I (122.3 %, 182.5 % i 105.5 %) i R-II (u opsegu 122.7 % do 200.9 %) kao referentnim preparatima.



Slika 3.3.2. Srednje plazma koncentracije teofilina, posle jednokratne oralne primene tableta (PF-I, PF-II, PF-III i R-I i R-II) kunićima

Tabele 3.3.4. Srednje koncentracije teofilina u plazmi kunića posle jednokratne oralne primene aminofilin tableta sa modifikovanim oslobađanjem, Petričević, 2010 (mg/L  $\pm$  Sd, n = 4).

Vreme (h)	PF - I	PF - II	PF - III	R-I	R-II
0.25	0.25 $\pm$ 0.14	0.26 $\pm$ 0.13	0.33 $\pm$ 0.23	0.06 $\pm$ 0.02	0.17 $\pm$ 0.07
0.50	0.59 $\pm$ 0.46	0.99 $\pm$ 0.42	0.61 $\pm$ 0.28	0.26 $\pm$ 0.09	0.52 $\pm$ 0.35
1	1.81 $\pm$ 1.07	2.68 $\pm$ 0.75	1.38 $\pm$ 0.44	1.35 $\pm$ 0.64	0.71 $\pm$ 0.29
2	2.87 $\pm$ 0.99	4.21 $\pm$ 0.89	2.17 $\pm$ 0.81	3.42 $\pm$ 1.05	1.29 $\pm$ 0.40
4	4.77 $\pm$ 0.49	5.25 $\pm$ 0.93	3.23 $\pm$ 0.48	4.82 $\pm$ 1.27	1.31 $\pm$ 0.27
6	7.34 $\pm$ 1.26	6.64 $\pm$ 1.28	4.64 $\pm$ 0.70	5.09 $\pm$ 0.91	1.44 $\pm$ 0.28
8	7.41 $\pm$ 1.10	7.31 $\pm$ 1.49	7.13 $\pm$ 1.58	5.27 $\pm$ 0.55	1.62 $\pm$ 0.20
10	7.19 $\pm$ 1.24	8.49 $\pm$ 1.49	7.56 $\pm$ 1.12	4.70 $\pm$ 0.74	2.04 $\pm$ 0.26
12	5.66 $\pm$ 1.61	9.22 $\pm$ 1.31	6.80 $\pm$ 2.58	3.64 $\pm$ 0.57	3.84 $\pm$ 0.76
24	2.29 $\pm$ 1.89	3.66 $\pm$ 0.61	1.12 $\pm$ 0.98	1.65 $\pm$ 0.81	3.82 $\pm$ 0.55
48	0.28 $\pm$ 0.18	0.80 $\pm$ 0.30	0.08 $\pm$ 0.12	0.34 $\pm$ 0.38	0.18 $\pm$ 0.20

Tabele 3.3.5. Farmakokinetički parametri teofilina kod kunića, posle jednokratne oralne primene aminofilin tableta sa modifikovanim oslobađanjem ( $\bar{x}$  sred  $\pm$  Sd, n = 4).

Formulacija	$C_{max}$ (mg/L)	$T_{max}$ (h)	$AUC_{0 \rightarrow 48}$ (mg h/L)	$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (mg h/L)	$F_{rel}$ (%)
PF - I	7.6 $\pm$ 1.01	7.5 $\pm$ 1.91	143.7 $\pm$ 47.36	150.8 $\pm$ 40.17	122.3 $\pm$ 46.81
PF - II	9.2 $\pm$ 1.31	12.0 $\pm$ 0.00	204.1 $\pm$ 6.58	224.8 $\pm$ 10.07	182.5 $\pm$ 25.95
PF - III	7.8 $\pm$ 1.25	10.5 $\pm$ 1.92	115.9 $\pm$ 37.98	125.9 $\pm$ 41.57	105.5 $\pm$ 29.02
R-I	5.6 $\pm$ 0.61	6.5 $\pm$ 1.92	105.3 $\pm$ 9.83	114.2 $\pm$ 19.70	/
R-II	4.2 $\pm$ 0.49	15.0 $\pm$ 6.00	113.2 $\pm$ 12.28	117.9 $\pm$ 15.41	94.3 $\pm$ 30.21

Veća relativna biološkaraspoloživost prototip formulacija u poređenju sa komercijalnim preparatima sreće se i u literaturi za slučajeve ispitivanja na ljudima (Nuwer i sar., 1990), psima (He i sar., 2010), kunićima (Tamilvanan i sar., 2011), kao i kod teofilinskih preparata (Emeje i sar., 2012) ispitivanih kod kunića.

Najveća absorpcija i najviša vrednost  $F_{rel}$  % nađena je kod PF-II.

Terapijska koncentracija teofilina u serumu bila je u opsegu od 5-15  $\mu$ g/ml. Pojava toksičnih efekata beleži se samo pri koncentracijama iznad 20  $\mu$ g/ml (Musko i sar., 2001), tako da su sve vrednosti dobijene ispitivanjem bile unutar bezbednih koncentracionih limita.

### 3.3.2.2.1. Dizajn eksperimenta u proceni značajnosti razlike kod dobijenih farmakokinetičkih parametara

Primenom generalnog jednofaktorskog dizajna (*General One Factor Design*) sprovedena je komparativna analiza farmakokinetičkih parametara prototip i komercijalnih tableta radi procene uticaja sastava formulacije, kao kritičnog atributa kvaliteta, na postignute farmakokinetičke parametre kod kunića.

Jedan kategorički nezavisno promenljivi faktor, sastav formulacije, sa 4 ponavljanja (ispitivanje na 4 pojedinačne životinje), tretiran je na 5 nivoa i sa 3 zavisno promenljive:

*Nezavisno promenljiva:*

$X_1$  sastav formulacije

*Nivoi*

1- PF-I K4M/carb

2- PF-II K100M

3- PF-III K4M

4- R-I HPMC visokog viskoziteta

5- R-II cetostearilalkohol

Zavisno promenljive:

$Y_{AUC}$  površina ispod krive plazma koncentracije teofilina 0-48h

$Y_{Cmax}$  maksimalna koncentracija teofilina u plazmi

$Y_{Tmax}$  vreme postizanja maksimalne koncentracije u plazmi

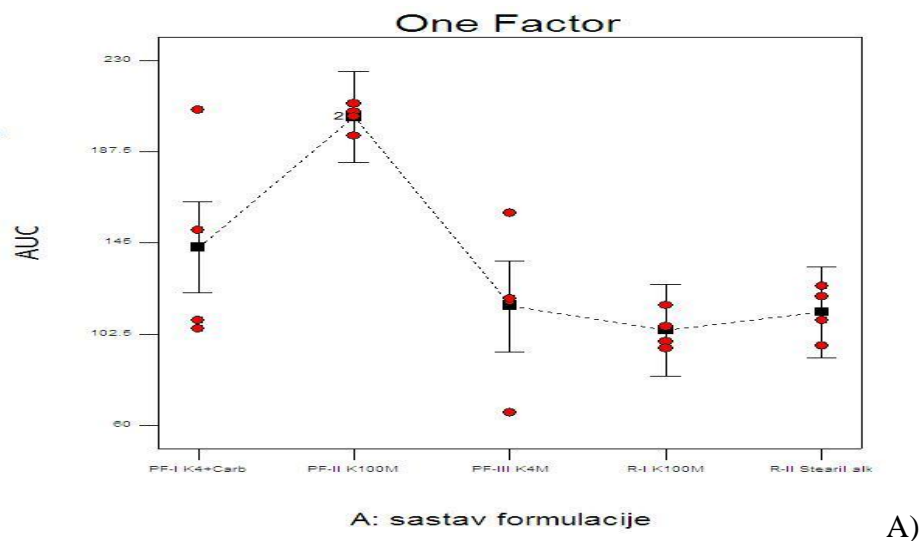
Plan eksperimenta sa vrednostima zavisno promenljivih prikazana je u tabeli 3.3.6.

Tabela 3.3.6. Plan eksperimenta sa vrednostima zavisno promenljivih, generalni jednofaktorski dizajn

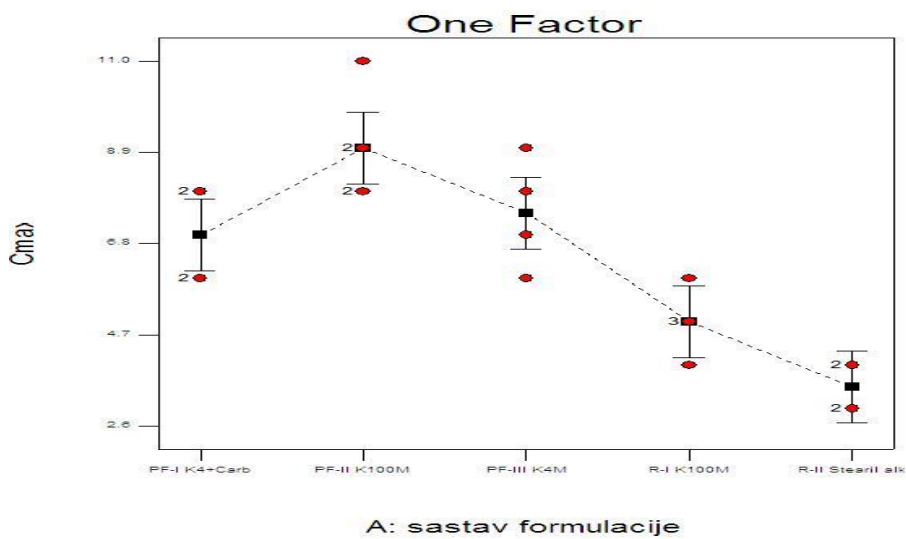
$X_I$ sastav formulacije	$Y_{AUC}$ (mgh/L)	$Y_{Cmax}$ (mg/L)	$Y_{Tmax}$ (min)
PF-I K4M/carb	109.9	6.8	480
PF-I K4M/carb	151.1	8.5	360
PF-I K4M/carb	105.8	6.6	360
PF-I K4M/carb	207.7	8.5	600
PF-II K100M	195.0	8.2	720
PF-II K100M	206.4	9.4	720
PF-II K100M	204.2	8.3	720
PF-II K100M	210.6	11.0	720
PF-III K4M	66.6	6.1	600
PF-III K4M	118.0	7.8	480
PF-III K4M	159.2	8.4	720
PF-III K4M	119.7	9.0	720
R-I K100M	118.7	4.8	480
R-I K100M	99.1	6.2	360
R-I K100M	96.9	5.5	480
R-I K100M	106.5	5.8	240
R-II stearil alkohol	97.6	3.7	720
R-II stearil alkohol	120.3	4.3	1440
R-II stearil alkohol	125.3	4.8	720
R-II stearil alkohol	109.7	3.8	720

Tabela 3.3.7. Pregled statističke značajnosti uticaja sastava formulacije na farmakokinetičke parametre

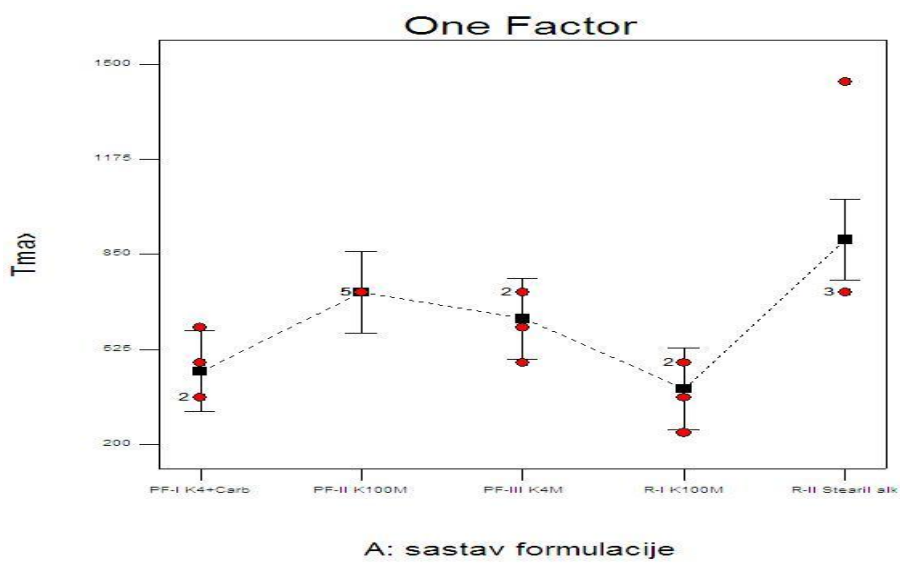
$AUC$	$p$	$Cmax$	$p$
PF-II / PF-I	0.008	PF-II / PF-I	0.0208
PF-II / PF-III	0.0005	R-I / PF-I	0.0208
PF-II / R-I	0.0002	R-I / PF-II	0.0001
PF-II / R-II	0.0004	R-I / PF-III	0.0056
$Tmax$	$p$	R-II / PF-I	0.0004
PF-II / R-I	0.0228	R-II / PF-II	0.0001
R-II / PF-I	0.0035	R-II / PF-III	0.0001
R-II / R-I	0.0014		



A)



B)



C)

Slika 3.3.3. Pregled odnosa sastava formulacije i farmakokinetičkih parametara,  $AUC_{0 \rightarrow 48}$  (a),  $C_{max}$  (b),  $T_{max}$  (c)



Statistička analiza pokazala je da sastav formulacije ima uticaja na dobijene farmakokinetičke parametre:  $AUC$  ( $p < 0.001$ ),  $C_{max}$  ( $p < 0.0001$ ) i  $T_{max}$  ( $p < 0.009$ ), a stepen značajnosti na farmakokinetičke parametre dat je u tabeli 3.3.7. i grafički na slici 3.3.3.

Značajno različita površina ispod krive  $AUC$ , je samo kod formulacije PF-II (204.06 mg/L), dok kod ostalih ispitivanih tableta, nije prisutna statistički značajna razlika. Niže vrednosti  $C_{max}$ , maksimalne koncentracije leka u plazmi, ali statistički značajne nađene su kod oba komercijalna proizvoda (5.6 mg/L i 4.2 mg/L) u odnosu na prototip formulacije, kod kojih razlike u  $C_{max}$ . prototip formulacija (7.5-12.0 mg/L) nisu statistički značajne.

Komercijalni proizvod R-II, karakteriše statistički značajna razlika u vremenu postizanja maksimalne koncentracije leka (15h).

Kod ostalih formulacija razlike u vremenu postizanja maksimalne koncentracije nisu statistički značajne (7.5h-12h).

Analiza ukazuje da su pripremljene formulacije sa modifikovanim oslobađanjem, stabilne strukture koje obezbeđuju produženo oslobađanje teofilina *in vivo* bez značajnih fluktuacija u vrednosti farmakokinetičkih parametara.

### 3.3.2.3. Uticaj sastava formulacija na dobijene brzine rastvaranja i resorpcione profile

Kod formulacije PF-II nađena je veća količina resorbovanog leka i bolja raspoloživost ( $AUC_{0\rightarrow 48h}=204.1$  mg h/L), uprkos prisustvu polimera visokog viskoziteta Methocel® K100M, što je u suprotnosti sa nađenom brzinom rastvaranja *in vitro*.

Kod formulacije PF-III, koja je na bazi hidrokispropilceluloze nižeg viskoziteta (Methocel® K4M), u *in vivo* uslovima dobijen je niži resorpcioni profil ( $AUC_{0\rightarrow 48h}=115.9$  mg h/L) iako je *in vitro* nađeno brže oslobađanje teofilina i u većoj količini u odnosu na PF-II. Formiranje gel barijere *in vitro* kod Methocel® K100M (PF-II) je sporije u poređenju sa Methocel® K4M (PF-III), i u nekim slučajevima ovo može biti objašnjenje za sporije/kasnije nastajanje odlaganja oslobađanja leka od očekivanog i brže oslobađanje aktivne supstance. Shodno tome može se pretpostaviti da u *in vivo* uslovima, usled sporijeg formiranja Methocel® K100M gel barijere u incijalnoj fazi, u poređenju sa Methocel® K4M dolazi do relativno bržeg oslobađanja leka i u većoj količini. Takođe, erozija (nađena kao vodeći mehanizam u okviru *in vitro* analize kod PF-II) može dodatno doprineti oslobađanju većih količina leka u kasnijoj fazi što bi objasnilo veće *AUC* vrednosti dobijene kod formulacije PF-II. Međutim vreme održavanja platoa oslobađanja je kraće, što govori u prilog nestabilnijem matriksu.

Neznatno niže vrednosti kinetičkih parametara  $C_{max}$  i  $T_{max}$  za PF-I (Methocel® K4M/Carbopol 971P NF), u poređenju sa PF-III (samo Methocel® K4M) ukazuju da se brzina rastvaranja i stepen apsorpcije smanjuju u prisustvu karbomera u formulaciji što je u saglasnosti sa *in vitro* rezultatima. Nema naglog skoka u oslobađanju leka, postiže se plato, a vreme u toku koga se održava produženo oslobađanje je duže, što se manifestuje kroz veću ukupnu površinu ispod krive absorpcije ( $AUC_{0\rightarrow 48h}=143.7$  mg h/L).

Za kombinaciju polimera kod PF-I formulacije, usporavanje brzine oslobađanja leka iz matriks tableta *in vitro*, ali i *in vivo* se može objasniti prisustvom sinergističke interakcije dva polimera (Draganoiu i sar., 2005; Smith, 2009). Jaka formirana gel struktura smanjuje količinu difundovanog leka što ima za rezultat usporavanje oslobađanja a što je u skladu sa rezultatima dobijenim u toku *in vitro* ispitivanja. Za obe formulacije PF-I i PF-III *in vitro* je nađeno da istim kombinovanim mehanizmom (difuzije i erozije) oslobađaju teofilin. Može se pretpostaviti da je struktura gel sloja kod PF-I jača i stabilnija usled prisustva karbomera i dovodi do produžavanja vremena

trajanja procesa oslobađanja i zbog toga se neznatno veća resorpcija postiže (nego kod PF-III). Kod PF-III u kasnijoj fazi je prisutan i efekat erozije hidroksipropilmetil celuloznog matriksa, dok karbomer zadržava stabilnu gel strukturu.

Uprkos razlici u sastavu komercijalnih tableta nađeno je slično *in vivo* ponašanje preparata R-I i R-II, na šta ukazuju vrednosti farmakokinetičkih parametara za  $C_{max}$  (5.58 mg/L i 4.18 mg/L) i  $AUC_{0\rightarrow 48h}$  (105.33 mg h/L i 113.23 mg h/L). Izuzetak je vrednost  $T_{max}$  koja je kod R-II iznosila 15h. Visoka vrednost u postizanju maksimalne koncentracije teofilina uslovljena je većim variranjem individualnih rezultata kod životinja kojima je aplikovan R-II (dobijena viša vrednost Sd), odnosno nađene vrednosti  $T_{max}$  su bile u opsegu od 5.4h do 24.5h (Petričević, 2010).

Phyllocontin 350 mg tablete su hidrofobni porozni matriks sistem (Puchun i sar., 2005) kod koga mehanizam i odgovarajuća kinetika oslobađanja teku procesom difuzije, odnosno Fickian ili Case I kinetikom (Wong i sar., 1992; Quadir i sar., 2003; Islam i sar., 2010). Nasuprot tome sve ispitivane formulacije bile su na bazi hidroksipropilmetilceluloze i karbomera koji formiraju hidrofilne bubreće i erodibilne matrikse sa difuzijom i erozijom kao mehanizmima oslobađanja leka.

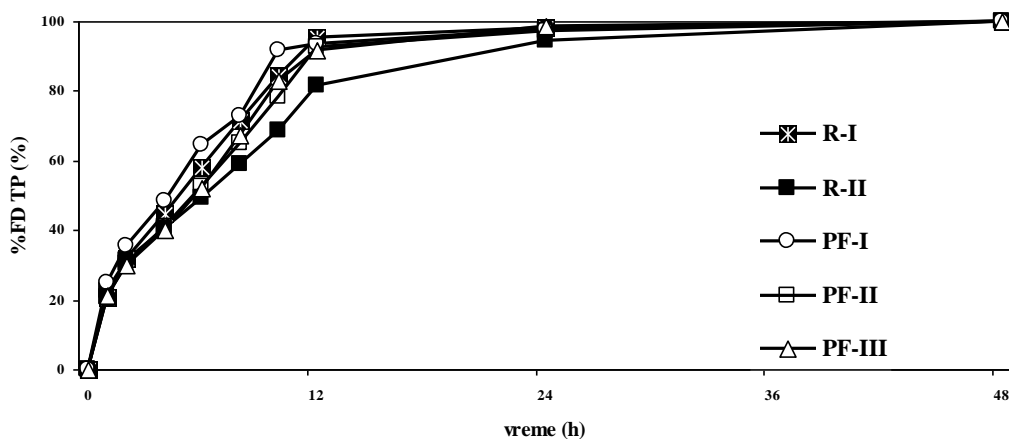
R-I komercijalni proizvod pokazao je veću sposobnost bubrenja. Uprkos razlici u sastavu u odnosu na R-II, nađeno je da je difuzija primarni mehanizam oslobađanja leka iz obe formulacije ali je konstanta brzine oslobađanja bila značajno viših vrednosti kod preparata R-II.

### 3.3.2.4. Analiza mogućnosti uspostavljanja *in vitro* / *in vivo* odnosa za prototip formulacije i komercijalne preparate

Procenat kumulativne frakcije (% *FD*) resorbovanog teofilina u toku vremena za sve ispitivane formulacije izračunat primenom Wagner-Nelson-ove jednačine (Wagner i Nelson, 1964; Mirza i sar., 2013) prikazan je tabelarno (tabela 3.3.8.) i grafički (slika 3.3.4.).

Tabela 3.3.8. Izračunate % *FD* kumulativne frakcije resorbovanog teofilina *in vivo*, kod prototip formulacija i komercijalnih preparata

% <i>FD</i> vreme (h)	<i>R-I</i>		<i>R-II</i>		<i>PF-I</i>		<i>PF-II</i>		<i>PF-III</i>	
	%	<i>Sd</i>	%	<i>Sd</i>	%	<i>Sd</i>	%	<i>Sd</i>	%	<i>Sd</i>
1	20.9	1.28	22.7	1.27	24.9	3.19	20.9	1.52	21.2	3.56
2	31.8	0.84	31.5	1.50	35.7	4.50	30.4	1.98	30.1	5.30
3	38.2	0.97	36.2	1.51	41.9	5.13	35.6	2.14	34.9	5.88
4	44.7	1.08	40.4	1.43	48.6	5.72	40.9	2.36	40.3	6.89
5	50.6	1.02	45.1	1.83	57.1	6.24	46.9	2.41	45.9	7.20
6	57.9	0.96	49.4	1.91	64.4	6.76	52.6	2.68	52.2	7.63
7	64.5	0.52	53.6	2.03	72.7	6.98	59.1	2.13	59.5	6.60
8	71.5	0.54	58.8	2.00	80.3	7.58	64.9	2.33	67.2	7.11
10	84.2	1.09	68.8	1.72	91.9	0.78	78.4	1.54	82.8	8.91
12	96.5	0.77	81.6	1.29	93.7	1.89	92.4	0.81	91.7	2.39
24	98.1	0.78	94.4	0.63	97.7	2.05	97.4	0.68	98.7	0.95
48	100.0		100.0		100.0		100.0		100.0	



Slika 3.3.4. Pregled kumulativnih frakcija %*FD* resorbovanog teofilina *in vivo*, kod prototip formulacija PF-I, PF-II, PF-III i komercijalnih preparata R-I, R-II

Uporedni pregled izračunatih kumulativnih frakcija resorbovanog teofilina *in vivo* (prikazanih tabelom 3.3.8. i slikom 3.3.4.) i eksperimentalno nađenih brzina rastvaranja *in vitro* (tabela 3.3.1) za interval od 0h - 8h ispitivanja, sa ciljem procene *in vitro/in vivo* odnosa, prikazan je grafički (slika 3.3.5.A-E).

Nađene *in vivo* krive (kumulativnih frakcija resorbovanog teofilina *in vivo*), prema literaturi (Zhu i sar., 2009) očekuje se da predstavljaju skup svih fenomena kojima je lek izložen u toku resorpcije, a što podrazumeva rastvaranje, oslobađanje i permeabilnost leka kroz intestinalne membrane.

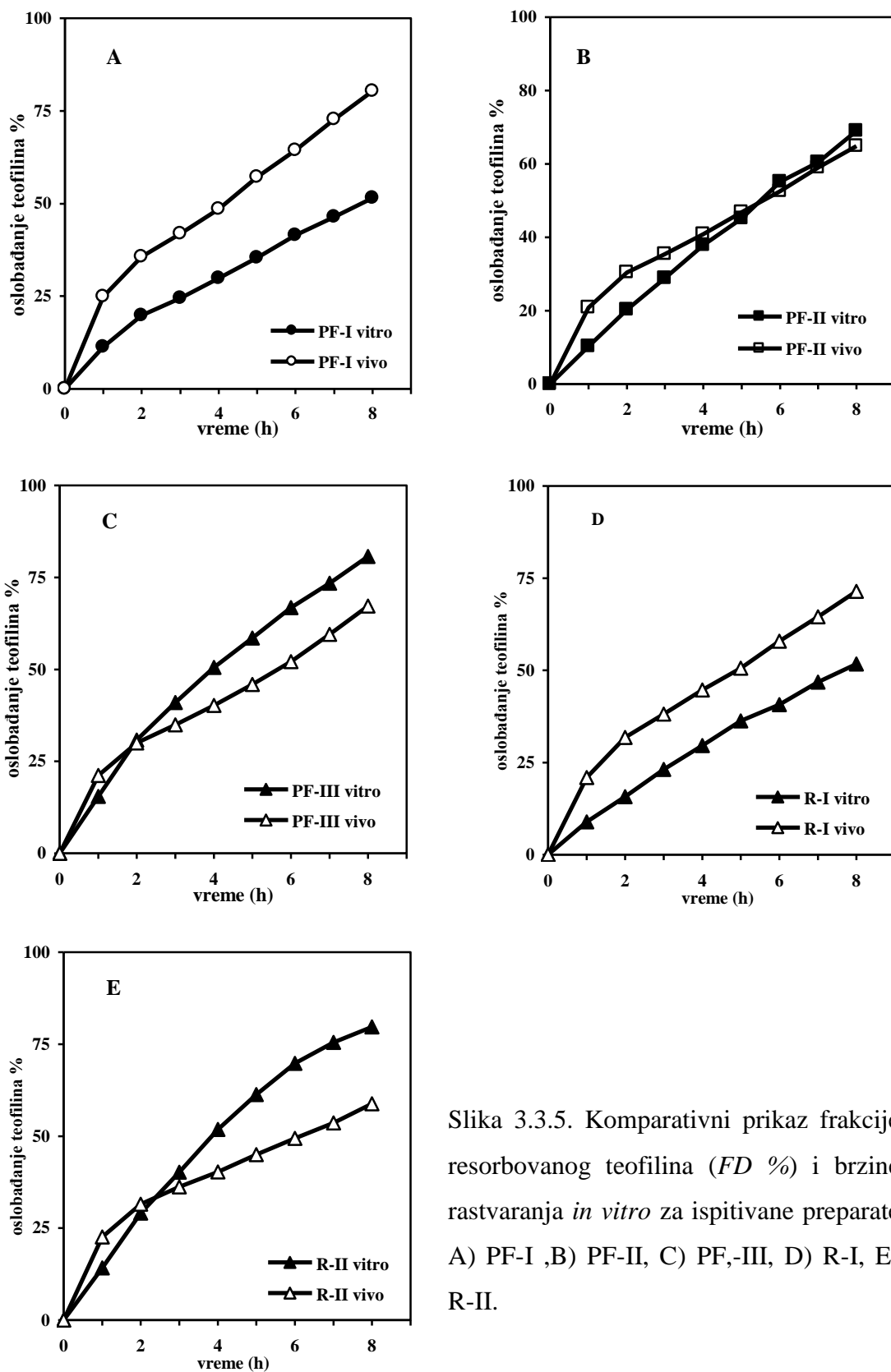
Iz grafičkih prikaza, *in vitro* i *in vivo* krive kod formulacije PF-I (slika 3.3.5-A) i R-I (slika 3.3.5-D) i PF-III (slika 3.3.5.-C) i R-II (slika 3.3.5.-E) pokazale su sličnost izgleda i oblika.

Pored grafičke analize, u cilju procene oblika i nagiba *in vivo* krivih izvršena je analiza primenom različitih matematičkih modela i nagib krive (što odgovara konstanti brzine oslobađanja odgovarajućeg reda), odsečak na x-osi (što odgovara *Lag/Burst* efektu) i difuzioni eksponent  $n$  su izračunati (tabela 3.3.9.) i poređeni sa izračunatim vrednostima kod *in vitro* krivih (tabela 3.3.3.)

Tabela 3.3.9. Kinetički parametri: konstanta brzine oslobađanja nultog reda  $k_0$ , kvadratnog korena  $k_2$  i Korsmayer-Peppasovim modelom  $k_p$ , difuzioni eksponent  $n$ , koeficijent korelacije  $r^2$  i vrednosti *Lag/Burst* efekta, kod krivih izračunatih kumulativnih frakcija absorbovanog teofilina

Run	Nultog reda			Higuchi model			Peppasov model			
	$r$	$k_0$ (min <sup>-1</sup> )	<i>Lag/Burst</i> (min)	$r$	$k_2$ (min <sup>-0.5</sup> )	<i>Lag/Burst</i> (min)	$r$	$k_p$ (min <sup>-n</sup> )	<i>Lag/Burst</i> (min)	$n$
PF-I	0.978	0.13	18.5	0.991	3.86	-7.7	0.996	2.61	-2.6	0.55
PF-II	0.972	0.10	16.6	0.994	3.04	-4.0	0.997	2.40	-1.5	0.53
PF-III	0.976	0.10	15.7	0.986	3.12	-5.3	0.994	2.41	-2.6	0.53
R-I	0.978	0.12	16.3	0.994	3.48	-7.4	0.998	2.02	-1.2	0.57
R-II	0.946	0.08	20.4	0.997	2.45	3.5	0.998	3.76	-0.8	0.44

*In vivo* krive pokazale su najbolju saglasnost sa Higuchi modelom kinetike kvadratnog korena, ukazujući na difuziju kao mehanizam oslobađanja, što su potvrdili i izračunati podaci za difuzioni eksponent  $n=0.53-0.57$ .



Slika 3.3.5. Komparativni prikaz frakcije resorbovanog teofilina ( $FD$  %) i brzine rastvaranja *in vitro* za ispitivane preparate A) PF-I ,B) PF-II, C) PF,-III, D) R-I, E) R-II.

Kod *in vitro* ispitivanja prototip formulacija ove vrednosti su bile u širem opsegu  $n=0.62-0.90$ , a veće slaganje za  $n$  u smislu difuzije, konstatovano je kod R-II *in vivo* ( $n=0.44$ ) i *in vitro* ( $n=0.42$ ) i nešto niže za R-I *in vivo* ( $n=0.57$ ) i *in vitro* ( $n=0.27$ ).

Nagibi *in vitro* krivih (konstante brzine oslobađanja po Higuchi modelu) PF-I ( $k_2=2.81\text{min}^{-0.5}$ ), R-I ( $k_2=3.08\text{min}^{-0.5}$ ) pokazuju sličnost sa nagibima kod *in vivo* krive PF-I ( $k_2=3.86\text{min}^{-0.5}$ ) i R-I ( $k_2=3.48\text{min}^{-0.5}$ ), mada je *in vitro* rastvaranje pokazalo usporenije slobađanje u toku prvog sata ispitivanja (slika 3.3.5.-A, 3.3.5.-D) u odnosu na *in vivo*. Nešto manje slaganje nagiba krivih *in vitro* PF-III ( $k_2=4.66\text{min}^{-0.5}$ ) i PF-II ( $k_2=4.16\text{min}^{-0.5}$ ) sa *in vivo* vrednostima PF-III ( $k_2=3.12\text{min}^{-0.5}$ ) i PF-II ( $k_2=3.04\text{min}^{-0.5}$ ), je nađeno.

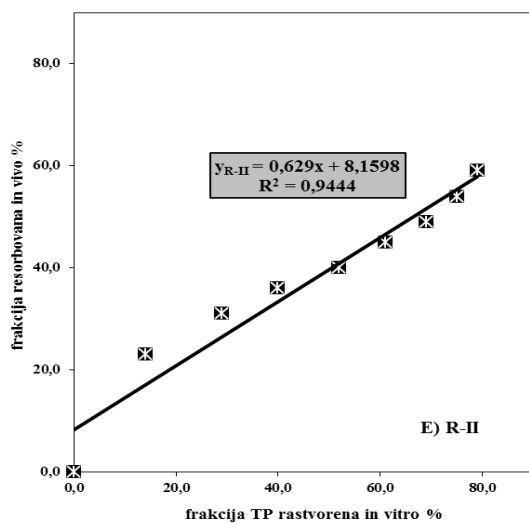
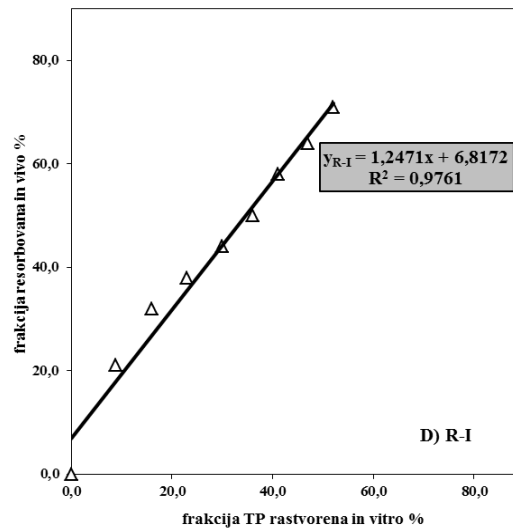
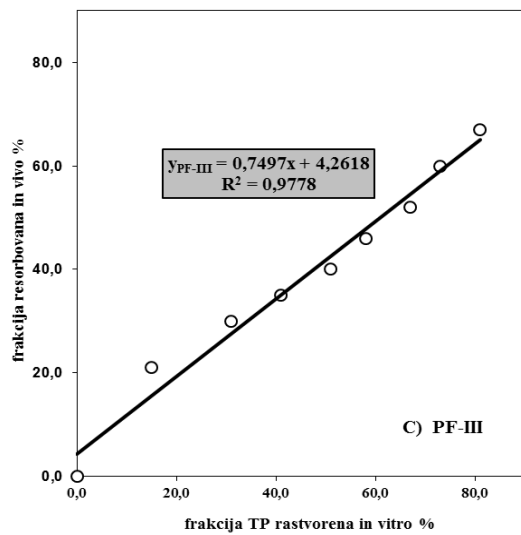
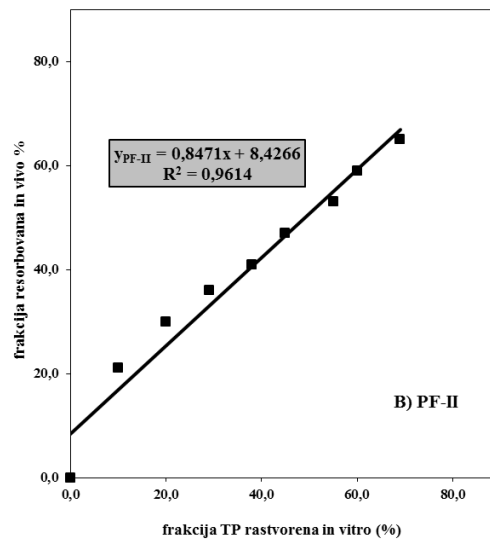
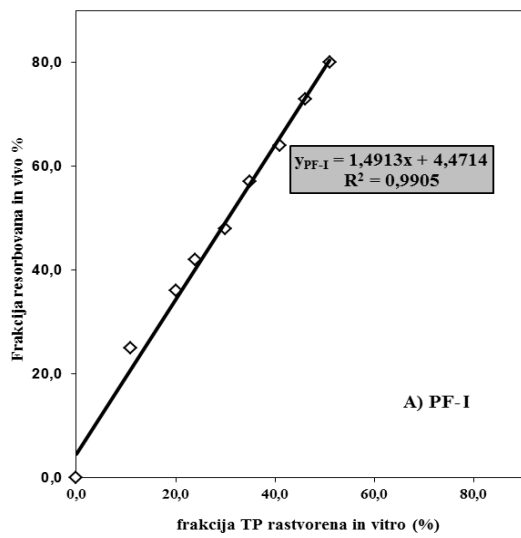
*In vitro/in vivo* korelacioni dijagrami dobijeni poređenjem resorbcijskih profila teofilina i *in vitro* brzina rastvaranja za odabrane prototip formulacije i komercijalne proizvode prikazani su na slikama 3.3.6. A-E.

Statistički parametri linearne regresione prave (koeficijent pravca prave, odsečak na y-osi i koeficijent korelacije  $R^2$ ) koji opisuju stepen uspostavljenog *in vitro/in vivo* odnosa nivoa A za ispitane formulacije dati su u tabeli 3.3.10.

Tabela 3.3.10. Statistički parametri linearne regresione prave pri ispitivanju *in vitro/in vivo* odnosa, formulacija PF-I, PF-II, PF-III i komercijalnih preparata R-I i R-II

	PF-I	PF-II	PF-III	R-I	R-II
<i>koeficijent korelacije <math>R^2</math></i>	0.991	0.961	0.978	0.976	0.944
<i>koeficijent pravca prave</i>	1.49	0.85	0.75	1.25	0.63
<i>odsečak na y-osi</i>	4.47	8.43	4.26	6.82	8.16

Nađeni koeficijenti korelacije *in vitro/in vivo* profila kod ispitivanih formulacija su iznosili od 0.944 (R-II), 0.961 (PF-II), 0.977 (PF-III, R-I) do 0.991 (PF-I). Prihvatljiv stepen korelacije između *in vivo* i *in vitro* podataka je za koeficijent korelacije  $R^2 \geq 0.97$  i da koeficijent pravca prave i odsečak teže vrednosti jedan odnosno nula (Huang i sar., 2004; Scheubel i sar., 2010). Koeficijent pravca prave, manje vrednosti od 1, ukazuje da odabrani *in vitro* model ne može dobro opisati *in vivo* ponašanje; koeficijent pravca veći od 1, manifestuje se sporijim *in vitro* rastvaranjem; negativna vrednost osečka na y-osi pokazuje da je *in vitro* rastvaranje brže, odnosno za pozitivan predznaka osečka na y-osi da je *in vivo* absorpcija brža (Scheubel i sar., 2010).



Slika 3.3.6. *In vitro/in vivo* korelacioni dijagrami prototip i komercijalnih preparata



Pozitivna vrednost odsečka uočena kod svih formulacija ukazuje da je *in vitro* brzina rastvaranja bila nešto sporija od brzine resorpcije u prvim satima ispitivanja, što se može pripisati tipu doziranog oblika, mehanizmu oslobađanja leka u *in vitro* i *in vivo* uslovima, a objasniti sporijim formiranjem gel barijere *in vivo* dovodeći do relativno bržeg oslobađanja leka i u većoj količini.

Prema naučnim principima Biofarmaceutskog sistema klasifikacije lekova (Yu i sar., 2002), *in vivo* razlike u brzini i količini apsorbovanog leka iz čvrstih doziranih oblika mogu se javiti usled razlika u brzini rastvaranja lekovite supstance *in vivo*. Kada je *in vivo* rastvaranje leka brže u poređenju sa dinamikom pražnjenja želuca, brzina i količina apsorbovane lekovite supstance proističe da su nezavisne od brzine rastvaranja leka. Ovo se odnosi na I grupu lekova biofarmaceutskog sistema klasifikacije (visoka rastvorljivost-visoka permeabilnost) kod formulacija sa trenutnim oslobađanjem i primenljivo je sve dok pomoćne materije inkorporirane u dozirani oblik ne počnu da imaju značajan uticaj na resorpciju leka. Stoga, ograničavajući faktor za oslobađanje leka je zapravo farmaceutski oblik (Souliman i sar., 2006). U slučaju teofilina, koji pripada I grupi lekova biofarmaceutskog sistema klasifikacije i formulisan je u obliku preparata sa modifikovanim oslobađanjem primenom polimera različitih tipova i viskoziteta, značajne razlike u sastavu doziranog oblika uslovljavaju i razlike u *in vitro* i *in vivo* dobijenim brzinama rastvaranja. U ovim slučajevima dinamika oslobađanja i mehanizam oslobađanja leka iz doziranog oblika, kontrolišu *in vitro/in vivo* brzine rastvaranja i resorpcije što je u saglasnosti sa raspoloživim literaturnim navodima (Bendas, 2009; Machai sar., 2009; Nandy i sar., 2011; Mirza i sar., 2013).

Kod prototip formulacije PF-I (slika 3.3.6.-A) u toku celog procesa rastvaranja/resorpcije postignut je visok stepen linearnosti/korelacije ( $R^2=0.991$ ) između eksperimentalno dobijenih *in vitro* i *in vivo* profila. Koeficijent pravca prave i odsečak su bili niskih vrednosti, ukazujući da *in vivo* profil resorpcije može biti predviđen na osnovu podataka o brzini rastvaranja *in vitro*.

Izvesne razlike između *in vitro* i *in vivo* rezultata i nešto niža vrednost koeficijenta korelacije ( $R^2=0.977$ ) nađena je kod prototip formulacije PF-III (slika 3.3.6.-C) i komercijalnog preparata R-I (slika 3.3.6.-D). Uprkos prihvatljivoj korelaciji, znatno veće rastvaranje teofilina *in vitro* (koeficijent pravca manji od 1) prisutno je kod PF-III, odnosno veća vrednost koeficijenta pravca od 1, ukazuje na neznatno brže rastvaranje *in vivo* kod komercijalnog preparata R-I.

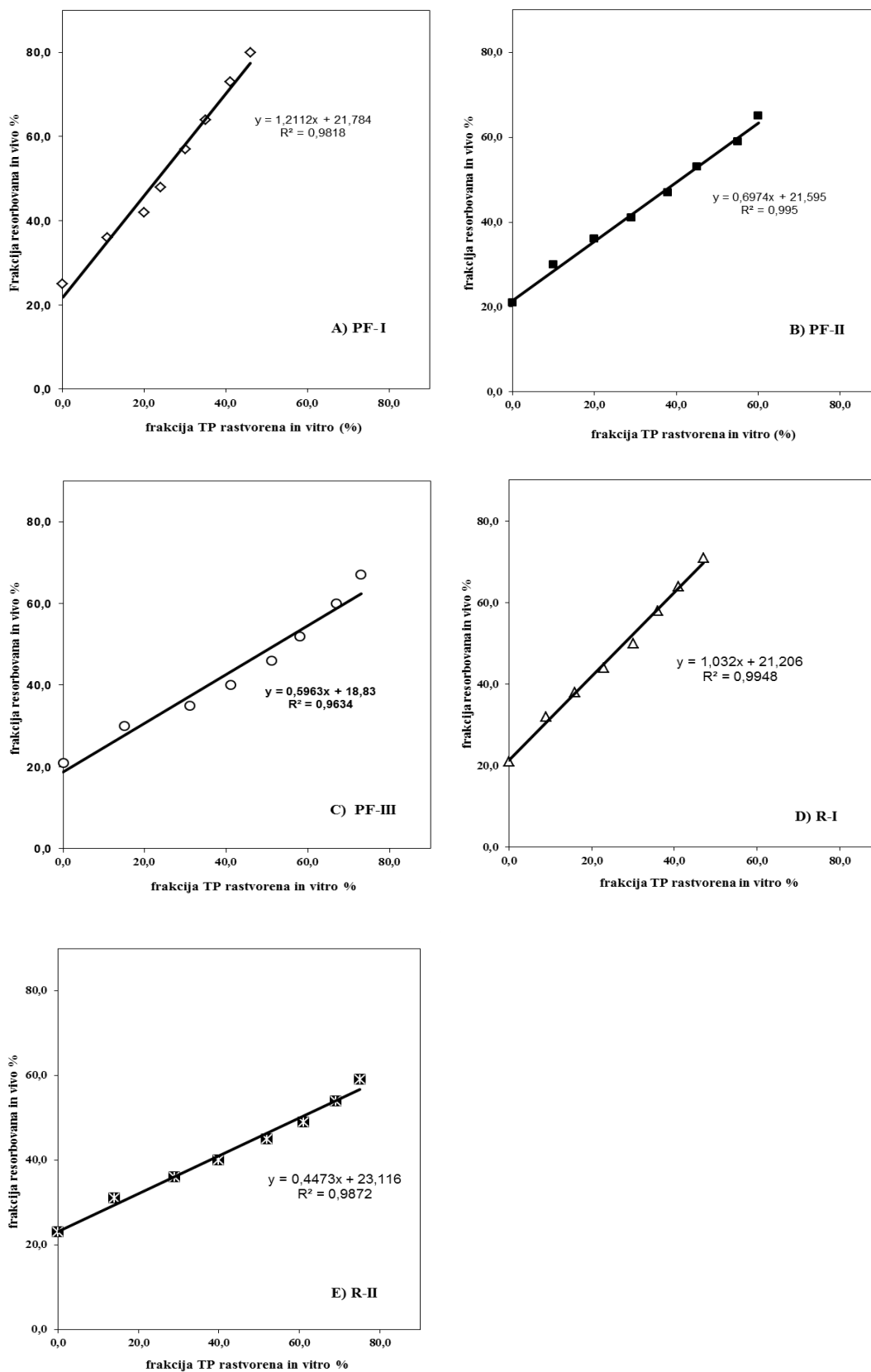
U slučaju komercijalnog preparata R-II (slika 3.3.6.-E), razlike između *in vitro* i *in vivo* rezultata znatno su više izražene, što se odražava na nižu vrednost koeficijenta korelacije ( $R^2=0.944$ ) i navodi na pretpostavku da *in vitro* test brzine rastvaranja ne reflektuje adekvatno *in vivo* ponašanje (Scheubel i sar., 2010). To može biti u vezi sa difuzionim mehanizmom oslobađanja iz inertnog polimernog matriksa, sporijom brzinom nego u *in vitro* uslovima.

Zbog uočenog intenzivnijeg oslobađanja teofilina u prvim satima inspitivanja, kod svih ispitivanih formulacija, primenjen je vremenskog faktora srazmere "*time scaling factor*" (u vrednosti od 60 min za *in vitro* profile oslobađanja), inače korišćen u slučaju sprovođenja *in vitro/in vivo* korelacije kod TheoDur tableta sa modifikovanim oslobađanjem teofilina (Mundy i Fassihi, 1995). Uz vremenski factor srazmere postignuto je uspostavljanje značajno višeg nivoa korelacije, kod svih formulacija sa prethodno dobijenim nižim koeficijentom korelacije; PF-II, R-I sa skoro idealnim koeficijentom pravca (1.12, 1.03) i značajno poboljšanim kod komercijalnog preparat R-II ( $R^2=0.987$ ).

*In vitro/in vivo* korelacioni dijagrami sa primenjenim vremenskim faktorom srazmere kod *in vitro* profila rastvaranja prikazani su na slikama 3.3.7. A-E., a dobijeni statistički parametri linearne regresione prave dati su u tabeli 3.3.11.

Tabela 3.3.11. Statistički parametri linearne regresione prave posle primene vremenskog faktora srazmere kod *in vitro* profila oslobađanja prototip formulacija i komercijalnih preparata

	PF-I	PF-II	PF-III	R-I	R-II
<i>koeficijent korelacije <math>R^2</math></i>	0.982	0.995	0.963	0.995	0.987
<i>koeficijent pravca prave</i>	1.12	0.70	0.60	1.03	0.45
<i>odsečak na y-osi</i>	21.78	21.60	18.83	21.20	23.11



Slika 3.3.7. *In vitro/in vivo* korelacioni dijagrami, prototip formulacija i komercijalnih preparata, uz primenu vremenskog faktora srazmere kod *in vitro* profila

Uz vremenski factor srazmere, kod svih formulacija postignut je zahtevani nivo korelacije ( $R^2 \geq 0.97$ ), tako da odabrani *in vitro/in vivo* model može biti primenljiv u daljim fazama razvoja tableta, uz primenu Test 3 USP.

Rezultati su u skladu sa literaturnim nalazima (El-Yazigi i sar., 1985; Karasulu i sar., 2006), da se primenom optimalnog linearnog korelacionog modela može postići *in vitro/in vivo* odnos nivoa A, pri testiranju teofilinskih preparata sa modifikovanim oslobađanjem i primenom kunića kao životinjskog modela.

### 3.3.2.5. Provera mogućnosti uspostavljanja *in vitro/in vivo* odnosa između prototip formulacija i komercijalnih preparata

Poređenje sličnosti *in vitro/in vivo* profila svake prototip formulacije u odnosu na *in vitro/in vivo* profil komercijalnog preparata (u literaturi označeno kao prividno sličan mehanizam absorpcije "*similar apparent absorption mechanism*" Scheubel i sar., 2010) je prikazan na slici 3.3.8.A-F, a statistički parametri linearne regresione analize koji opisuju stepen uspostavljene korelacije u tabeli 3.3.12.

Tabela 3.3.12. Statistički parametri linearne regresione prave pri međusobnoj korelaciji *in vitro/in vivo* profila prototip formulacija i komercijalnih preparata

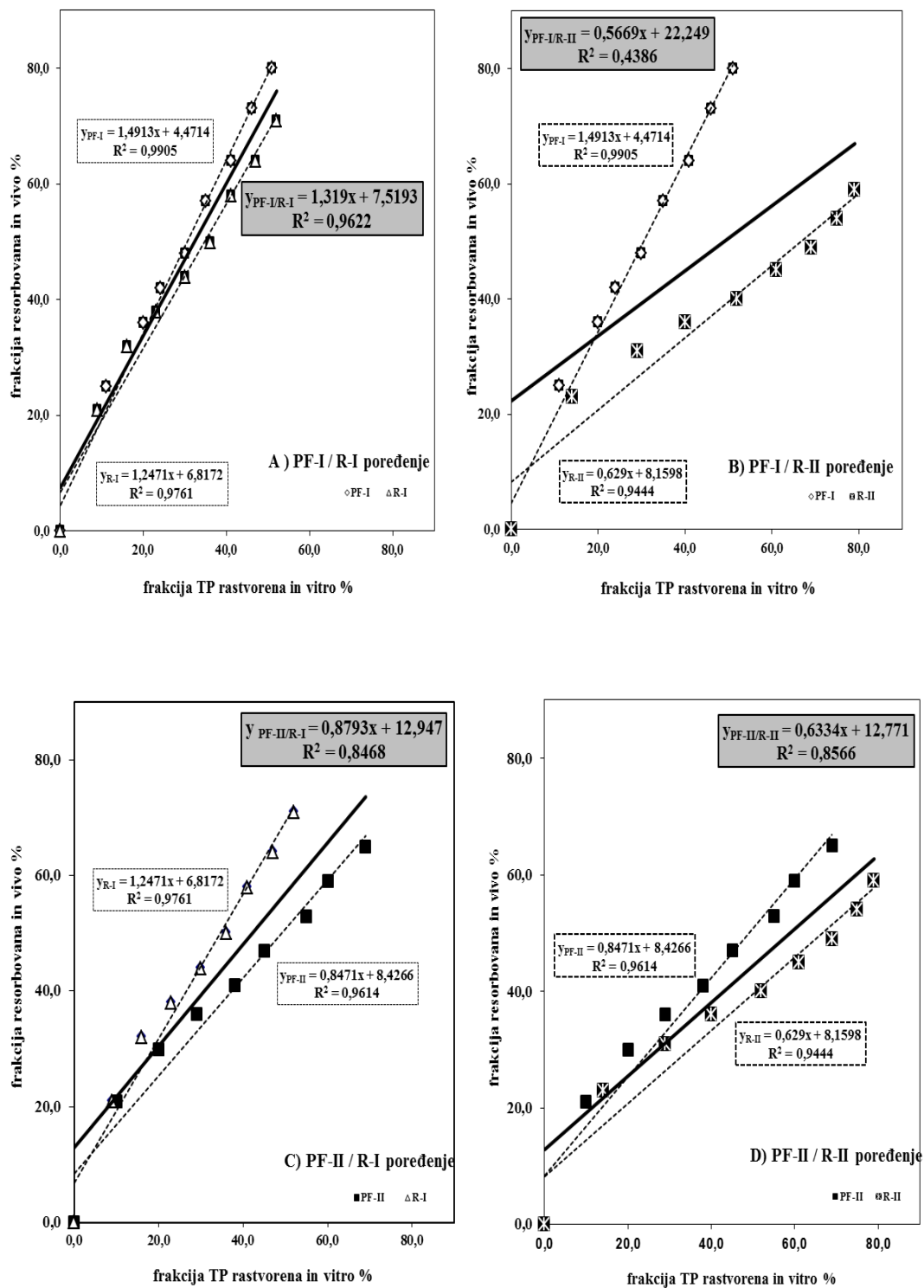
	<i>koeficijent korelacije</i> $R^2$	<i>koeficijent pravca</i> <i>prave</i>	<i>odsečak</i> <i>na y-osi</i>
<b>PF-I/R-I</b>	0.962	1.32	7.52
<b>PF-I/R-II</b>	0.439	0.57	22.25
<b>PF-II/R-I</b>	0.847	0.88	12.95
<b>PF-II/R-II</b>	0.857	0.63	12.77
<b>PF-III/R-I</b>	0.680	0.68	16.16
<b>PF-III/R-II</b>	0.949	0.66	8.20
<b>R-I/ R-II</b>	0.587	0.58	19.12

Zadovoljavajuća korelacija okarakterisana relativno visokim sveukupnim koeficijentom korelacije nađena je za formulaciju PF-I i komercijalni proizvod R-I ( $R^2=0.962$ ), i nešto niža vrednost korelacije utvrđena je kod PF-III i R-II ( $R^2=0.949$ ).

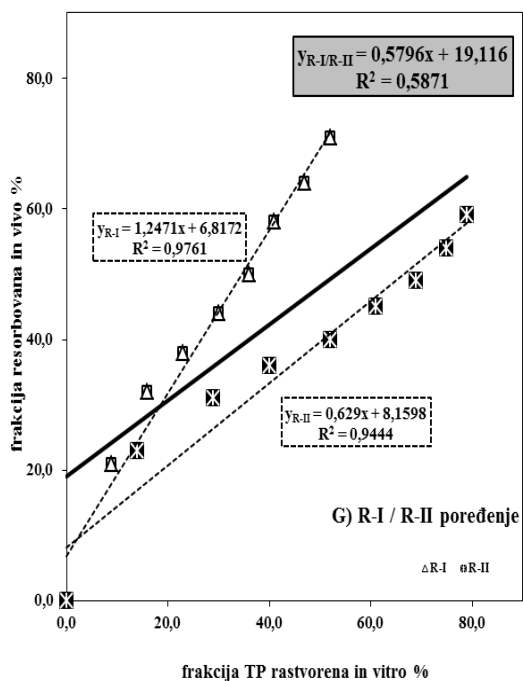
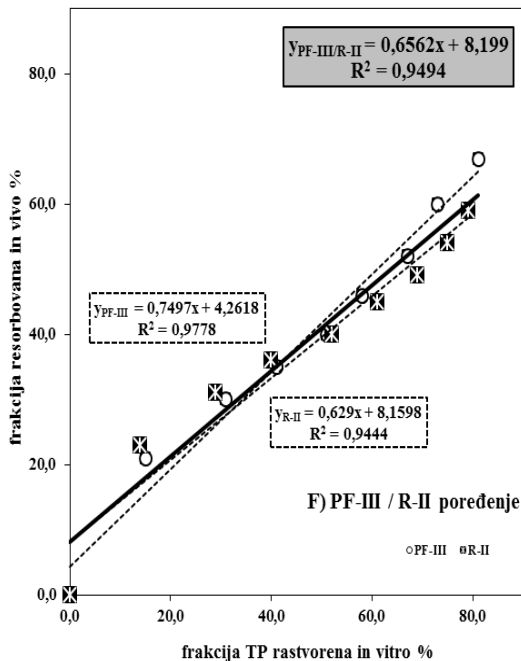
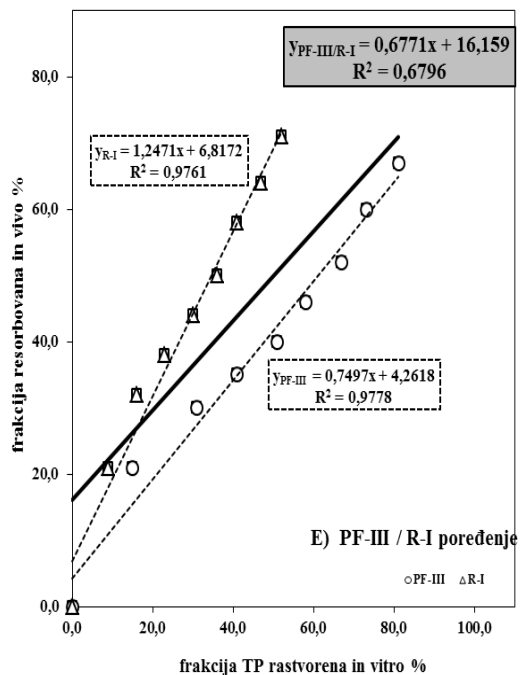
Nizak stepen korelacije kod PF-II sa komercijalnim proizvodima i između samih komercijalnih proizvoda je u saglasnosti sa *in vitro* postavljenim profilima oslobađanja pa time i očekivan.

Dobijen prihvatljiv nivo korelacije primenom linearne regresione analize za zbirne setove podataka PF-I i R-I ( $R^2=0.962$ ), PF-III i R-II ( $R^2=0.949$ ) uz korišćeni *in vitro* metod, Test 3 USP, pokazuje da postoji potreban nivo sličnosti odgovarajuće prototip formulacije i konkretnog komercijalnog proizvoda u *in vivo* uslovima.

U ranoj fazi razvoja, pripremljene prototip formulacije su bile vrlo sličnih *in vitro* karakteristika sa komercijalnim proizvodima, kako bi se postiglo da i ponašanje *in vivo* bude što sličnije.



Slika 3.3.8.A-D. Korelacioni dijagrami između prototip formulacije i komercijalnih preparata



Slika 3.3.8.E-G. Korelacioni dijagrami između prototip formulacije i komercijalnih preparata

Za potrebe daljeg razvoja moguće je predvideti *in vivo* profile drugih formulacija sličnih karakteristika kao što su i spitivane. Dobijeni rezultati u skladu su sa literaturnim nalazima Mirze i sar., 2013, gde *in vitro/in vivo* model kreiran na određenim proizvodima, može imati sposobnost predviđanja *in vivo* profila formulacija sa sličnim mehanizmima oslobađanja, dok korelacija proizvoda različitih mehanizama oslobađanja najčešće izostaje ili je manjeg stepena.

Ovim se može objasniti i niža vrednost korelacije *in vitro/in vivo* setova podataka utvrđena kod PF-III i R-II ( $R^2=0.949$ ), jer se odnosi na sisteme različitog sastava i mehanizma oslobađanja. Međutim iako niža, nađena vrednost korelacije je korisna i prihvatljiva za potrebe rane faze razvoja proizvoda (Mirza i sar., 2013).



### 3.3.2.6. Provera predvidivosti uspostavljenog *in vitro/in vivo* modela i predvidivosti primenjenog *in vitro* testa ispitivanja brzine rastvaranja

Za procenu predvidivosti *in vitro/in vivo* modela, primenjena je inverzna Wagner-Nelson-ova metoda, predložena od strane Gohel i sar., 2005, a bazirana na predviđanju *in vivo* resorpcije na osnovu *in vitro* eksperimentalno nađenih brzina rastvaranja teofilina.

Izračunate vrednosti za  $C_{max}$  i  $AUC_{0-8h}$  odnose se na interval od 0-8h i uz procenat greške predviđanja date su u tabeli 3.3.13.

Tabela 3.3.13. Eksperimentalno nađeni i predviđeni farmakokinetički parametri

	PF-I <i>obt</i>	PF-I <i>pred</i>	PF-II <i>obt</i>	PF-II <i>pred</i>	PF-III <i>obt</i>	PF-III <i>pred</i>	R-I <i>obt</i>	R-I <i>pred</i>	R-II <i>obt</i>	R-II <i>pred</i>
$C_{8h}$ (mg/L)	7.41	5.6	7.31	7.70	7.13	8.62	5.27	5.70	1.62	2.29
%PE	24.43 %		-5.34 %		-20.90 %		-8.16 %		-41.36 %	
$AUC_{8h}$ (mgh/L)	37.58	34.97	39.94	38.84	27.47	30.47	31.21	30.11	9.83	13.23
%PE	6.95 %		2.75 %		-10.92 %		3.86 %		-14.59 %	

Greška predviđanja manja od 15 % za  $AUC_{0-8h}$  i  $C_{8h}$  nađena je za dve prototip formulacije PF-II i R-I i u skladu sa propisanim zahtevima, na osnovu čega sledi da primenjeni model i odabrani test brzine rastvaranja može u potpunosti da podrži razvoj i buduće analize i poređenja kod formulacija sličnih sastava (Macha i sar., 2009; Delvadia i sar., 2012).

Kod formulacija PF-I, PF-III i R-II konstatovana je greška predviđanja veća od 15 % za  $C_{8h}$ , a u granicama zahteva za  $AUC_{0-8h}$ . Slična zapažanja (Mirza i sar., 2013) objašnjena su činjenicom da se *in vivo* profili mogu razlikovati u pogledu vrednosti  $C_{max}$ , ali ukoliko su profili absorpcije,  $AUC$  površine ispod krive, sličnih oblika i vrednosti linearna zavisnost i korelativnost podataka je prisutna. Navedeni podaci su osnova za konstatovane prihvatljive korelacije između *in vivo* i *in vitro* rezultata kod PF-I odnosno PF-III, kao i nađene korelativnosti među proizvodima PF-I/R-I i PF-III/R-II.

U skladu sa svim dobijenim rezultatima može se zaključiti da postoji vrlo kompleksan odnos između *in vitro* rezultata brzine rastvaranja i *in vivo* podataka ispitivanja na životinjama. Korelacija se može naći samo kod specifičnih proizvoda. Upotreba rezultata *in vitro* brzine rastvaranja za predviđanje procesa resorpcije leka je uslovljena sastavom farmaceutskog oblika i mehanizmom oslobađanja leka (Munday i Fassihi, 1995; Mirza i sar., 2013).

### 3.3.2.7. Procena mogućnosti primene kunića kao životinjskog modela za *in vivo* ispitivanja u ranoj fazi razvoja formulacije

U cilju procene mogućnosti primene kunića kao životinjskog modela za potrebe *in vivo* ispitivanja u ranoj fazi razvoja farmaceutskog oblika, poređeni su *in vivo* profili dobijeni na zdravim dobrovoljcima (iz raspoloživih publikacija) i *in vivo* eksperimentalno nađeni rezultati na kunićima, za komercijalni preparat R-II, Phyllocontin 350 mg tablete (tabela 3.3.14.).

Tabela 3.3.14. Pregled literaturnih farmakokinetičkih parametara za Phyllocontin tablete

naziv	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$T_{max}$ (h)	$AUC_{0-24h}$ ( $\mu\text{g h/ml}$ )	$AUC_{0-\infty}$ ( $\mu\text{g h/ml}$ )	Referenca
<b>Phyllocontin 350mg tablete</b>	<b>4.3</b> (3.0-6.5)	<b>5.3</b> (2-8)	<b>68.75</b> (41.6-122.7)	<b>100.64</b> (55.2-187.5)	EP 0 284 849 B1, 1993 *
<b>Phyllocontin 350mg tablete</b>	<b>5.6</b>	<b>5.3</b>	/	<b>123.4</b>	Purdue Pharma Product monograph **
<b>Phyllocontin 225mg tablete</b>	<b>3.6</b>	<b>5.3</b>	/	<b>73.7</b>	Purdue Pharma Product monograph **
<b>Phyllocontin 225mg tablete</b>	<b>4.2</b> (2.8-5.8)	<b>5.5</b> (4-7)	<b>60.44</b> (43.7-75.2)	<b>78.19</b> (70.2-110.2)	Lin i sar., 1990
<b>Phyllocontin retard 225mg tablete</b>	<b>7.8</b>	<b>4.0</b>	<b>123.93</b>	<b>153.11</b>	Möller i Langebucher, 1982

\* - Evropski patent EP 0 284 849 B1, 1993; \*\* - <http://www.rxmed.co/pharmaceutical>

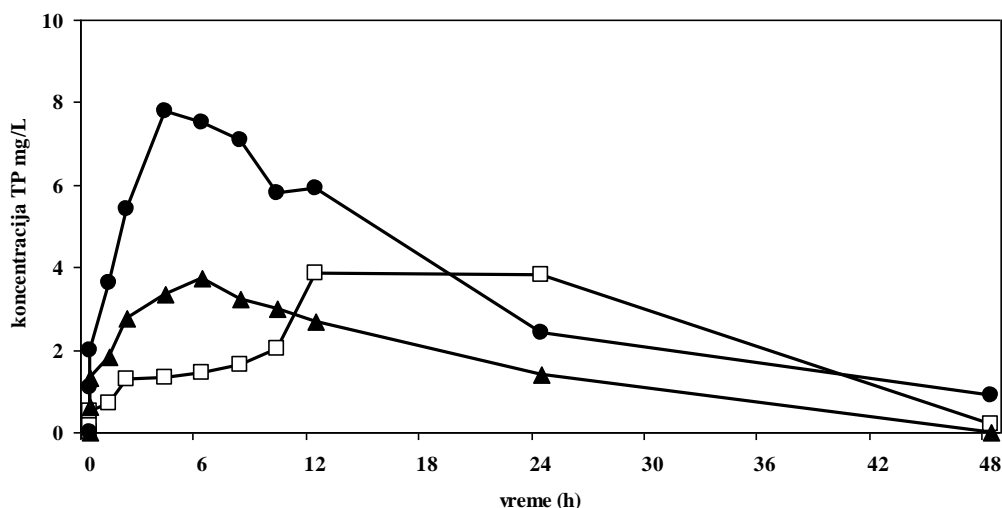
Mali broj radova je na raspolaganju, koji se odnosi na *in vivo* ispitivanja Phyllocontin 350 mg tableta na zdravim dobrovoljcima, i prvenstveno su to vrednosti farmakokinetičkih parametara, ali ne i kompletni pregledi plazma koncentracije teofilina u krvi ispitanika.

U slučaju R-I komercijalnog preparata ova vrsta literaturnih podataka nije dostupna.

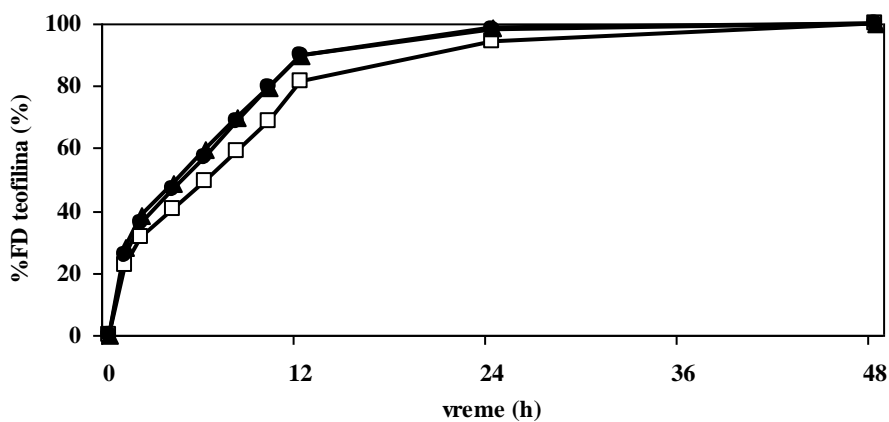
Pregled raspoloživih farmakokinetičkih parametara za preparat sa cetostearilalkoholom i hidroksietilcelulozom, Phyllocontin tablete, kao što je i komercijalni preparat R-II korišćen u *in vivo* ispitivanjima na kunićima, prikazan je u tabeli 3.3.14.

Grafički prikaz koncentracije teofilina u krvi ispitanika prema literaturi (Lin i sar, 1990; Möller i Langenbucher, 1982), dat je na slici 3.3.9.

Na osnovu farmakokinetičkih parametara i grafičkog prikaza proizilazi da su maksimalna koncentracija teofilina u plazmi i  $AUC_{0-\infty}$  površina ispod krive zavisnosti plazma koncentracije od vremena, sličnih vrednosti kod dobrovoljaca iz navoda literature izuzev nešto viših koncentracija nađenih od strane Möller i Langebuher, 1982.



Slika 3.3.9. Srednja plazma koncentracija teofilina posle jednokratne oralne primene Phyllocontin tableta *in vivo* zdravim dobrovoljcima (▲) prema Lin i sar., 1990; (●) prema Moller i Langenbucher, 1992; (□) i kod kunića, komercijalni proizvod R-II, prema Petričević, 2010.



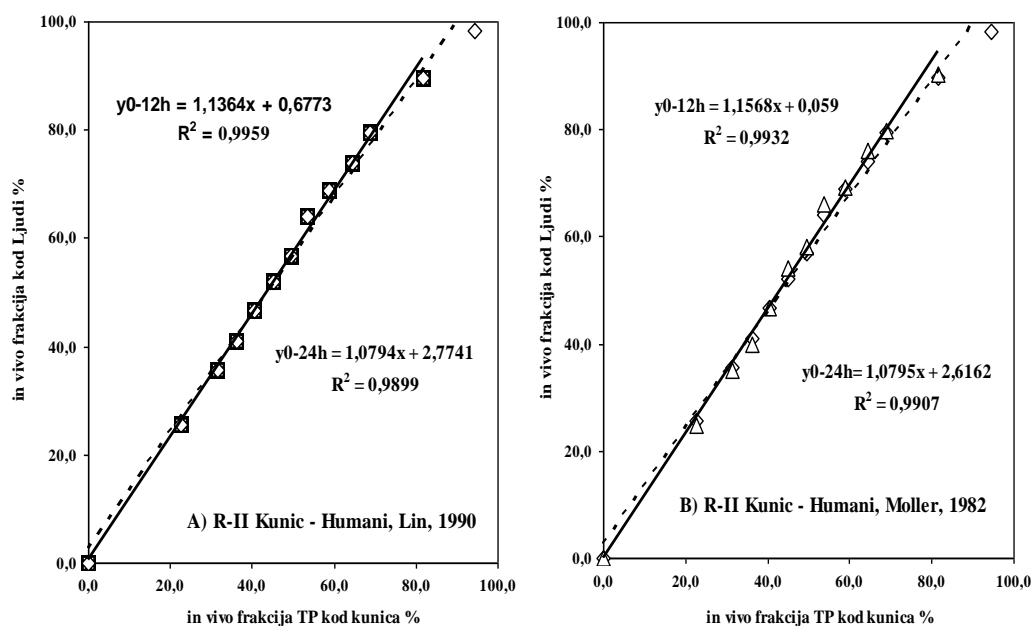
Slika 3.3.10. Procenat kumulativne frakcije (% *FD*) resorbovanog teofilina u toku vremena, za Phyllocontin tablete na zdravim dobrovoljcima (▲) prema Lin i sar., 1990; (●) prema Moller i Langenbucher, 1992; (□) i kod kunića, komercijalni proizvod R-II, prema Petričević, 2010.

Procenat kumulativne frakcije (% *FD*) resorbovanog teofilina u toku vremena kod ispitivanja na dobrovoljcima, izračunat je Wagner Nelsonovom metodom, i vrednosti su date grafički, slika 3.3.10.

Radi procene sličnosti kumulativnih frakcija dobijenih *in vivo* kod kunića, odnosno na zdravim dobrovoljcima, primenjena je regresiona analiza, a stepen postignute korelativnosti kroz statističke parametre prikazan je u tabeli 3.3.15. i na slici 3.3.11.A-B.

Tabela 3.3.15. Statistički parametri regresione analize *in vivo* profila oslobađanja kod kunića i zdravih dobrovoljaca

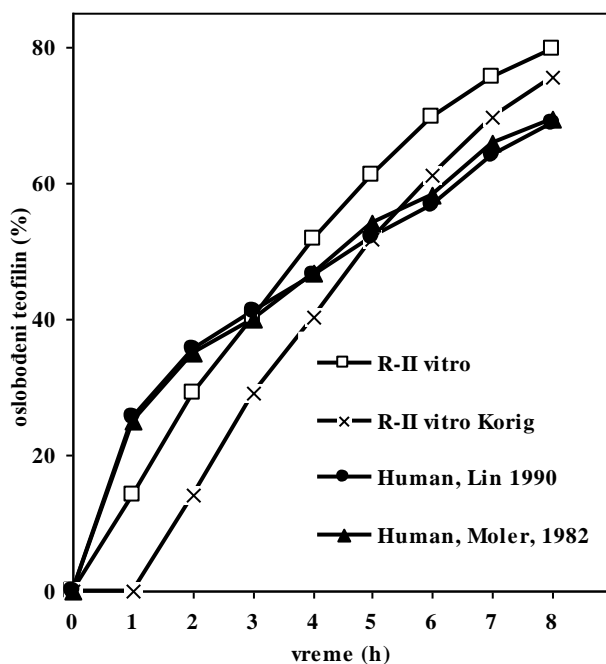
	<i>Interval 0 - 24h</i>		<i>Interval 0 - 12h</i>	
	Kunić/Hum Lin, 1990	Kunić/Hum Moller, 1990	Kunić/Hum Lin, 1990	Kunić/Hum Moller, 1990
<i>koeficijent korelacije R<sup>2</sup></i>	0.989	0.991	0.996	0.993
<i>koeficijent pravca prave</i>	1.08	1.08	1.14	1.16
<i>odsečak na y-osi</i>	2.77	2.62	0.68	0.06



Slika 3.3.11. Prikaz odnosa kumulativne frakcije (% *FD*) resorbovanog teofilina u toku vremena, posle primene kod kunića i na zdravim dobrovoljcima prema Lin i sar., 1990 (A), odnosno Moller i Langenbuher, 1982 (B).

Rezultati pokazuju da su *in vivo* profili kod kunića, odnosno dobrovoljaca slični, što se ogleda u visokim vrednostima koeficijenta korelacije, većim od 0.98 (za ispitivani interval 0-24h), odnosno za interval do 12h i 0.99.

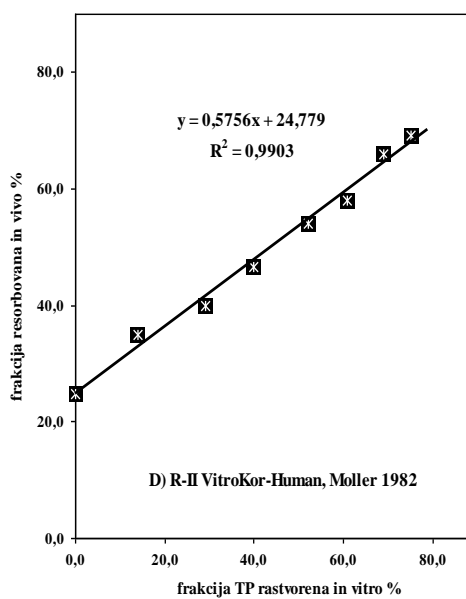
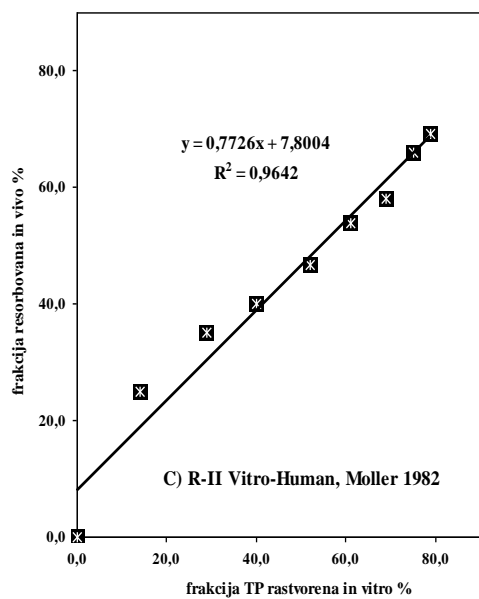
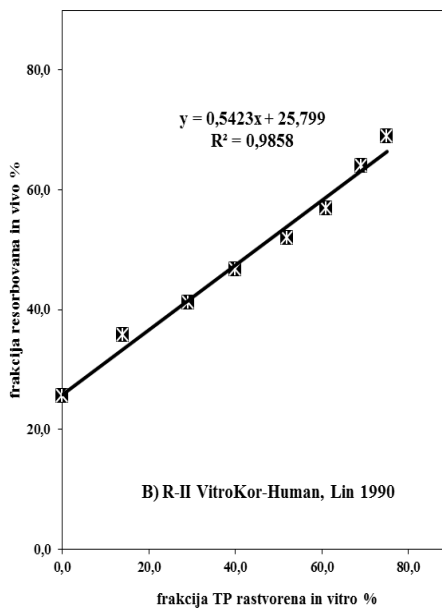
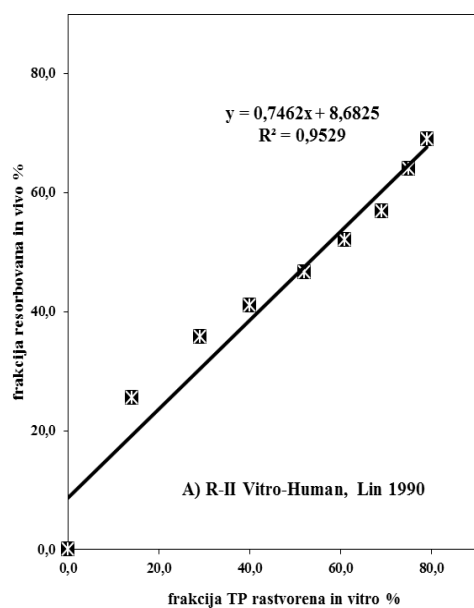
Uporedni pregled izračunatih kumulativnih frakcija resorbovanog teofilina *in vivo* kod dobrovoljaca kao i na kuniću i eksperimentalno nađenih brzina rastvaranja *in vitro* kod preparata R-II, za interval poređenja od 0h - 8h ispitivanja, sa ciljem procene *in vitro/in vivo* odnosa, prikazan je grafički (slika 3.3.12.). Uočava se sličnost *in vivo* profila resorpcije kod kunića i zdravih dobrovoljaca u pogledu oblika i nagiba krivih, dok su količine teofilina oslobođene kod ljudi nešto većih vrednosti.



Slika 6.12. Komparativni prikaz frakcije resorbovanog teofilina ( $FD$  %) i brzina rastvaranja *in vitro* za ispitivane preparate

Analiza *in vitro/in vivo* odnosa između *in vitro* profila brzine rastvaranja R-II i *in vivo* profila na zdravim dobrovoljcima, prikazana je na slici 3.3.13.A-D., a statistički parametri postignute linearne regresione analize dati su u tabeli 3.3.16.

Kao i kod kunića, pri ispitivanju na zdravim dobrovoljcima, uočene su razlike u korelaciji između *in vitro* i *in vivo* profila i vrednosti od  $R^2=0,953$  kod Lin i sar, 1990, odnosno  $R^2=0,936$  za Möller i Langebucher, 1982, tako da je korelacija bila ispod postavljenog limita  $R^2 \geq 0.97$ ). Uočeno je znatno brže oslobađanje teofilina *in vivo* pri primenjenim uslovima u početnoj fazi testiranja.



Slika 3.3.13. *In vitro/in vivo* korelacioni dijagrami sa *in vivo* profilima dobrovoljaca (A, C) i uz primenu vremenskog faktora srazmere za *in vitro* profile (B,D).

Tabela 3.3.16. Statistički parametri regresione analize za primenjeni *in vitro/in vivo* modela pri analizi kod zdravih dobrovoljaca, pre i posle primene vremenskog faktora srazmere na *in vitro* profil oslobađanja

	Kunić/Hum Lin, 1990	Kunić/Hum Moller, 1990	<i>sa vremenskim faktorom srazmere</i>	
			Kunić/Hum Lin, 1990	Kunić/Hum Moller, 1990
<i>koeficijent korelacije R<sup>2</sup></i>	0.953	0.964	0.986	0.990
<i>koeficijent pravca prave</i>	0.75	0.77	0.54	0.57
<i>odsečak na y-osi</i>	8.68	7.80	25.78	24.78

Posle primene vremenskog faktora srazmere, postiže se značajno poboljšanje korelacije, a dobijeni koeficijenti korelacije su mnogo viših vrednosti i u okviru zahtevanih granica,  $R^2=0,986$  i  $R^2=0,985$ .

Dobijeni rezultati ukazuju na opravdanost primene kunića kao životinjskog modela pri *in vivo* ispitivanjima u ranoj fazi razvoja farmaceutskog oblika, radi sagledavanja mogućnosti predviđanja *in vivo* ponašanja razvojnih preparata.



### 3.3.2.8. Izbor optimalne prototip formulacije za dalja ispitivanja

Na osnovu rezultata ispitivanja kritičnih formulacionih komponenata i parametara odgovornih za kritične attribute kvaliteta gotovog proizvoda, *in vitro* nađenog profila oslobađanja (nakon 2h/30 %, za 4h oko 50 %, posle 8h oko 80 %) u skladu sa preporukama Ph Eur, *in vivo* dobijenih rezultata na kunićima i uspostavljenog *in vitro/in vivo* odnosa nivoa A za prototip formulaciju PF-III ( $R^2=0.978$ ), ista je izdvojena kao prihvatljiva za dalja ispitivanja.

Kao referentni je izdvojen R-II, Phyllocontin 350 mg tablete.

Ustanovljen je *in vitro* profil brzine rastvaranja PF-III formulacije, obzirom da nije definisan raspoloživim farmakopejama, na osnovu komparativnih analiza referentnog komercijalnog preparata R-II, Phyllocontin 350 mg, a potvrđen kroz ispitivanja u okviru numeričke optimizacione procedure mešanog eksperimentalnog dizajna i uspostavljanja *in vitro/in vivo* odnosa.

Postavljeni *in vitro* profil brzine rastvaranja je: posle 2h: 20-40 % (*ciljana vrednost 30 %*) , 4h: 40-60 % (*ciljana vrednost 50 %*), 6h: 55-80 % (*ciljana vrednost 65 %*) i posle 8h: 75-95 % (*ciljana vrednost 85 %*).

Na osnovu procene greške predviđana za nađeni *in vitro/in vivo* korelacioni model, konstatovano je da se *in vitro* metoda po modelu Test 3 USP, oficinalnog kod ispitivanja teofilin kapsula sa produženim oslobađanjem, može koristiti kao biorelevantan u daljim ispitivanjima i predviđanjima *in vivo* ponašanja formulacija sličnih sastava i mehanizama oslobađanja.

Ustanovljeni parametri *in vitro* metode su: aparatura II USP sa rotirajućom lopaticom, brzina mešanja 50 rpm, pri temperaturi  $37 \pm 2$  °C, u 900 ml medijuma: veštački želudačni sok bez pepsina /0-1h i veštački crevni sok bez enzima /2-8h.

## **4. ZAKLJUČAK**

## **Prvi deo:**

### ***In vitro* ispitivanja**

Na osnovu sprovedenih *in vitro* ispitivanja pet komercijalnih proizvoda sa modifikovanim i jednog proizvoda sa trenutnim oslobađanjem, sa domaćeg i stranih tržišta i sopstvenih formulacija, primenom različitih eksperimentalnih uslova, postavljen je preliminarni *in vitro* metod ispitivanja brzine rastvaranja teofilina obzirom da isti nije farmakopejski oficinalan (osim za kapsule sa modifikovanim oslobađanjem teofilina), za potrebe razvoja prototip formulacija.

Analizom komercijalnih proizvoda sa modifikovanim oslobađanjem teofilina sa domaćeg i stranog tržišta, različitog kvalitativnog sastava, primenom pet *in vitro* testova ispitivanja brzine oslobađanja, nađeno je različito ponašanje i brzine oslobađanja teofilina u opsegu od 47 % do preko 90 % (u zavisnosti od preparata i primenjenog testa). Konstatovano je prisustvo praktično svih mehanizama oslobađanja, kvazi Fick-ovom ili *Case I* kinetikom ( $n=0.42$ ), difuzijom ( $n=$  oko 0.50), anomalnim transportom ( $n=0.57-0.77$ ), *Case II* transportom ( $n=0.89$ ) kao i mehanizmom relaksacije ( $n=0.92$ ).

Uočeno različito ponašanje i dinamika oslobađanja teofilina, se može objasniti uticajem same formulacije, odnosno razlikama u tehnološkim rešenjima, primenjenim pomoćnim supstancama i proizvodnim postupcima za postizanje modifikovanog oslobađanja teofilina.

Najrobustnijom se pokazala formulacija na bazi etilcelulozom obloženih peleta (R-V) tako da su pri svim ispitivanjima, dobijeni vrlo slični profili uz oslobađanje preko 90 % leka kinetikom koja teži ili odgovara *Case II* transportu odnosno kinetici nultog reda.

Nekompletno i najsporije oslobađanje pokazao je preparat na bazi hidroksipropilmetilceluloze (R-I) oslobodivši 47 % do 56 % leka (zavisno od testa), mehanizmom difuzije ( $n=0.51$ ) ili anomalnog transporta ( $n=0.62-0.67$ ).

Srednje brzine oslobađanja od 72 % do 85 % u zavisnosti od testa pokazala su dva preparata (R-II, R-III) na bazi lipidnog poroznog matriksa (cetostearilalkohol u prisustvu hidroksietilceluloze) sa različitim mehanizmima oslobađanja (u zavisnosti od metode ispitivanja) kvazi Fick-ovom difuzijom ( $n=0.42$ ), difuzijom ( $n=0.50-0.54$ ), anomalnim transportom ( $n=0.73-0.78$ ) ili *Case II* transportom.

Različito oslobađanje (od 54 % do 74 %) značajno uslovljena testom i načinom izvođenja ispitivanja nađeno je kod preparata na bazi hidroksipropilmetilceluloze i glicerilpalmitostearata (R-IV).

Dobijeni slični profili oslobađanja ispitivanjem Testom 3 USP u odnosu na Test 1 USP ili Test 9 USP naveli su na pretpostavku da razlike pH vrednosti fosfatnog pufera ili tipa aparature nemaju uticaj na dinamiku oslobađanja teofilina iz ispitivanih preparata.

Dobijeni slični profili oslobađanja pri sukcesivnoj zameni medijuma u toku vremena (metoda poluizmene) u odnosu na kompletnu zamenu medijuma posle prvog sata ispitivanja (Test 3 USP), ukazali su da se zbog veće jednostavnosti izvođenja, USP postupku može dati prednost.

Konstatovani slični profili oslobađanja teofilina, u opsegu pH =3.0-7.5, odnosno niži profili oslobađanja u medijumu pH=1.2, pri ispitivanju komercijalnog preparata aminofilina sa trenutnim oslobađanjem ukazali su na potrebu primene kombinacije medijuma u toku ispitivanja.

Nađeno je da su, pri primeni aparature II USP rotirajuće lopatice i brzini mešanja 50rpm i aparature I USP rotirajuće korpice pri brzinama 50rpm i 100rpm dobijeni slični profili oslobađanja iz tableta okruglog i ovalnog oblika. Pri brzini mešanja 75 rpm kod aparature I, kod oba oblika tableta, uočene su nešto više brzine oslobađanja teofilina.

Dobijeni slični profili oslobađanja, pri ispitivanju tableta različitog oblika (okruglog i ovalnog), pri istim eksperimentalnim uslovima ispitivanja pokazali su da raspoložive geometrije i dimenzije alata nemaju značajnog uticaja na brzinu rastvaranja teofilina iz tableta na bazi hidroksipropilmetilceluloznog matriksa.

Na osnovu svih dobijenih *in vitro* rezultata zaključeno je da se kod daljih ispitivanja može koristiti *in vitro* metoda koji odgovara Test 3 USP: aparatura II USP sa rotirajućom lopaticom, brzina mešanja 50rpm, pri temperaturi  $37 \pm 2$  °C, i 900 ml medijuma: veštački želudačni sok bez pepsina u toku prvog sata i veštački crevni sok bez enzima od 2-8h ispitivanja.

## **Drugi deo:**

### **Farmaceutsko-tehnološka ispitivanja hidrofилnih matriks sistema na bazi hidroksipropilmetilceluloze i karbomera**

Za potrebe razvoja i izbora prototip formulacija, poštujući koncept dizajna kvaliteta *QbD*, definisan je ciljani profil kvaliteta proizvoda *QTPP* za aminofilin tablete sa modifikovanim oslobađanjem teofilina.

Na osnovu *QTPP* i sprovedene analize uticaja kritičnosti, utvrđeno je da na efikasnost i bezbednost kod pacijenta imaju uticaj kritični atributi kvaliteta *CQA* gotovog proizvoda: fizički atributi (oblik/veličina) tablete, sadržaj, uniformnost sadržaja i profil brzine rastvaranja. Atributi kvaliteta gotovog proizvoda kao identifikacija, stepen čistoće i mikrobiološka čistoća takođe predstavljaju *CQA*, ali se dalje nisu razmatrali jer formulacija i procesni parametri nemaju na njih uticaj.

Prema FMECA modelu izvođenja inicijalne procene rizika konstatovano je da: atributi kvaliteta materijala aktivne supstance, koja pripada I grupi lekova po Biofarmaceutskom sistemu klasifikacije, ne pokazuju rizik za kvalitet gotovog proizvoda, pri primeni metode vlažne granulacije.

Identifikovane kritične formulacione komponente i promenljive: granulati sa modifikovanim oslobađanjem teofilina, intragranularni matriks formirajući polimer (hidroksipropilmetilceluloza) i njegov udeo u ukupnom polimernom matriksu, pokazuju srednji nivo rizika na fizičke attribute kvaliteta tableta (oblik/veličinu), a zajedno sa ekstragranularnim polimerom (karbomer) visok nivo rizika na profil oslobađanja lekovite supstance, dok je uticaj na sadržaj i uniformnost sadržaja niskog nivoa rizika. Prisustvo vezivnog sredstva i nerastvornog punioca pokazuje srednji nivo rizika na fizičke attribute kvaliteta tableta.

Uz pomoć punog faktorijalnog dizajna potvrđen je efekat značajnog usporavanja oslobađanja iz matriksa na bazi kombinacije Methocel® K100M najvišeg viskoziteta sa Carbopolom® 971P NF, što do sada nije bilo prisutno u literaturi. Takođe je ovaj efekat konstatovan primenom nižeg udela karbomera, 12.5 % u kombinaciji sa hidroksipropilmetilcelulozom, u odnosu na literaturu naveden (15 %, 22.5 %).

Analizom faktorskih efekata, konstatovana je obrnuto proporcionalna zavisnost, količine karbomera u matriksu, na brzinu oslobađanja leka, dok je uticaj ukupne količine kombinacije polimera sa većim značajem samo u početnoj fazi ispitivanja.

Mehanizam nastanka značajnog usporavanja oslobađanja pri primeni kombinacije Methocel®K100M/Carbopol® 971P NF, pretpostavljeno je da se može pripisati sinergističkom uticaju oba polimera. Još uvek nije u potpunosti objašnjen u literaturi, ali se smatra da u prvaj fazi dominira uticaj intragranularno prisutne hidroksipropilmetil celuloze na oslobađanje teofilina, a u kasnijoj fazi efekat ekstragranularno dodatog karbomera nadvladava usled nagrađenog jačeg sloja.

Za primenjene udele polimera, vezivnog sredstva i nerastvornog punioca od 3% odnosno 4%, dobijeni su fizički atributi kvaliteta tableta u granicama zahteva, što ukazuje da odabrana kombinacija polimera i ekscipijenasa uz primenjeni postupak izrade (metoda vlažne granulacije) obezbeđuju dobra protočna, kompresibilna svojstva mase i attribute kvaliteta tableta u granicama zahteva.

Dizajnom smeše postignut je razvoj formulacija matriks tableta na bazi intragranularno (Methocel® K100M ili Methocel® K4M) i ekstragranularno (Carbopolom® 971P NF) kombinovanih polimera. Konstatovan je značajan obrnuto proporcionalni uticaj koncentracije karbomera na profil brzine rastvaranja teofilina.

Sa povećanjem udela karbomera usporava se brzina oslobađanja, menja vrednost difuzionog eksponenta  $n$ , isti se smanjuje i preko anomalnog transporta (kao kombinovanog mehanizma erozije i difuzije) teži ka procesu difuzije, dok je za matrikse na bazi samo intragranularno dodate hidroksipropilmetilceluloze, *Case II transport*, odnosno erozija vodeći mehanizam oslobađanja. Kod istog udela ekstragranularnog, a različitog viskoziteta i istog udela intragranularnog polimera hidroksipropilmetilceluloze K100M ili K4M, uočava se sličnost profila formulacija, iskazana kroz faktor sličnosti, ukazujući na veći uticaja karbomera u procesu oslobađanja.

Numerička optimizaciona procedura eksperimentalnog dizajna smeše omogućila je izdvajanje tri optimalne prototip formulacije uz izračunatu grešku predviđanja ispod 10 %, i konkretne sastave formulacija sa optimizovanim udelima polimera i brzinama oslobađanja sličnim postavljenim ciljanim profilima (kod komercijalnih preparata).

U odnosu na komercijalni preparat R-I, Aminofilin 350 mg, izdvojena je optimalna prototip formulacija F11 kao kombinacija Methocel® K4M/Carbopol® 971P NF udela 60/20, (sličnost profila  $f_1=4.1$ ,  $f_2=84.2$ ), za preparat R-II, Phyllocontin 350 mg, F7 formulacija na bazi Methocel® K100M, (sličnost profila  $f_1=3.3$ ,  $f_2=83.4$ ) i u odnosu na komercijalni preparat R-IV, Phyllocontin 350 mg, F9 formulacija na bazi Methocel® K4M, (sličnost profila  $f_1=8.1$ ,  $f_2=70.7$ ) je odabrana.

### Treći deo:

#### Ispitivanje *in vitro/in vivo* odnosa

Za prikupljene *in vitro* i *in vivo* rezultate oslobađanja teofilina, primenom linearne regresione analize ispitana je mogućnost uspostavljanja preliminarnog *in vitro/in vivo* odnosa, nivoa A, kod izdvojene tri prototip formulacije i odabrana dva komercijalna proizvoda

Dobijeni *in vitro* profili optimizovanih formulacija i komercijalnih proizvoda su okarakterisani model-zavisnim i model-nezavisnim metodama: slični profili oslobađanja su konstatovani kod prototip i komercijalnih preparata R-I/PF-I ( $f_2=84.1$ ) i R-II / PF-III ( $f_2=83.4$ ) dok je profil formulacije PF-II u poređenju sa referentnim bio različit. Različite brzine oslobađanja kinetikom nultog reda ili kvadratnog korena su konstatovane, najmanja kod PF-I (na bazi Methocel® K4M/Carbopol® 971P NF) i komercijalnog proizvoda R-I; veća kod PF-II (sa Methocel® K100M), a najveća kod PF-III (sa Methocel® K4M) i R-II (cetostearilalkohol i hidrosietilceluloza); različiti mehanizmi oslobađanja su izračunati: anomalni transport kod PF-III ( $n=0.71$ ), i PF-I ( $n=0.62$ ), , Case II transport i erozija (relaksacija) kao vodeći mehanizam kod PF-II ( $n=0.90$ ), Fickian difuzija kod R-II ( $n=0.42$ ) i kvazi-difuzija kod R-I ( $n=0.27$ ).

*In vivo* resorpcioni profili dobijeni ispitivanjima na eksperimentalnim životinjama kunićima, opisani su kroz izračunate farmakokinetičke parametre:  $C_{max}$ , maksimalnu plazma koncentraciju;  $T_{max}$ , vreme dostizanja maksimalne koncentracije leka u plazmi; površine ispod krive plazma koncentracije teofilina u funkciji vremena ( $AUC_{0 \rightarrow t}$  i  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ ) i relativne biološke raspoloživosti ( $F_{rel}$  %). Za sve tri optimizovane prototip formulacije konstatovano je produženo oslobađanje leka u *in vivo* uslovima, za  $C_{max}=7.61$  mg/L - 9.2 mg/L,  $T_{max} = 7.5h$  - 12.0h i  $AUC_{0 \rightarrow 48h} = 115.90$  mg h/L - 204.6 mg h/L, a relativna biološka raspoloživost teofilina bila je većih vrednosti (105.5 % - 182.5 %) u poređenju sa komercijalnim preparatima.

Statistička analiza pokazala je da sastav formulacije ima uticaja na dobijene farmakokinetičke parametre:  $AUC$  ( $p<0.001$ ),  $C_{max}$  ( $p<0.0001$ ) i  $T_{max}$  ( $p<0.009$ ), a statistički značajne razlike u dobijenim vrednostima konstatovane su za  $AUC$  formulacije PF-II (204.06 mg h/L),  $C_{max}$ , kod oba komercijalna proizvoda R-I i R-II (5.6 mg/L i 4.2 mg/L) i  $T_{max}$  kod R-II (15h).



Na osnovu dobijenih *in vivo* rezultata, primenom Wagner-Nelson metode, izračunat je %FD procenat kumulativne frakcije resorbovanog teofilina (profili resorpcije), i podaci primenjeni pri ispitivanju mogućnosti uspostavljanja *in vitro/in vivo* odnosa. Primenom linearne regresione analize i nađenih statističkih parametara (koeficijent pravca prave, odsečka na y-osi i koeficijent korelacije  $R^2$ ) konstatovana je mogućnost uspostavljanja *in vitro/in vivo* odnosa, nivoa A kod ispitanih formulacija, pri čemu je koeficijent korelacije bio unutar postavljenog zahteva ( $R^2 \geq 0.97$ ) za PF-I (0.991) i PF-III, R-I (0.977), a van zahteva kod R-II (0.944) i PF-II (0.961).

Kod formulacije PF-I u toku celog procesa rastvaranja/apsorpcije postignut je visok stepen linearnosti/korelacije ( $R^2=0.991$ ), a u slučaju komercijalnog preparata R-II razlike između *in vitro* i *in vivo* rezultata znatno su bile više izražene, što se odrazilo na nižu vrednost koeficijenta korelacije ( $R^2=0.944$ ).

Usled uočenog intenzivnijeg *in vivo* oslobađanje teofilina u prvim satima ispitivanja, primenjen je vremenski faktor srazmere (*time scaling factor*) za *in vitro* profile oslobađanja, čime je uspostavljena korelacija kod praktično svih ispitivanih tableta uz nešto više vrednosti koeficijenta korelacije ( $R^2 = 0.982-0.995$ ). Značajno je podignut stepen korelativnosti kod komercijalnog preparat R-II ( $R^2=0.987$ ). Pri tome su za jednu pototipformulaciju PF-I i komercijalni proizvod R-I, dobijeni koeficijenti pravca bliski jedinici (1.12 i 1.03). Intenzivniju brzinu resorpcije u prvim satima ispitivanja u poređenju sa *in vitro* oslobađanjem, pošto se radi o matriks sistemima, najverovatnije je moguće objasniti sporijim formiranjem gel barijere *in vivo*, dovodeći do relativno bržeg oslobađanja leka i u većoj količini.

Poređenjem sličnosti setova podataka *in vitro/in vivo* profila prototip formulacije i komercijalnog preparata (u literaturi označeno kao prividno sličan mehanizam absorpcije, *similar apparent absorption mechanism*) primenom linearne regresione analize, nađena je korelacija kod dva para formulacija PF-I / R-I ( $R^2=0.949$ ) i PF-III / R-II ( $R^2=0.962$ ). Na osnovu literaturnih navoda, uočena niža vrednost koeficijenta korelacije se objašnjava činjenicom da su poređeni preparati različitog sastava i mehanizma oslobađanja (porozni lipidni matriks i hidrofilni bubreći matriks).

Za procenu predvidivosti *in vitro/in vivo* modela, primenjena je inverzna Wagner-Nelson-ova metoda, koja predstavlja jednu od novijih i manje korišćenih metoda.

Procena predvidivosti *in vitro/in vivo* modela, za interval do 8h ispitivanja i farmakokinetičke parametre  $C_{8h}$  i  $AUC_{0\rightarrow 8h}$  potvrđena je kod jedne formulacije PF-II i jednog komercijalnog proizvoda R-I (greška predviđanja manja od 15 %), dok je kod ostale dve formulacije (PF-I, PF-III) i jednog komercijalnog proizvoda (R-II) greška predviđanja bila u granicama zahteva za  $AUC_{0\rightarrow 8h}$ , a veća od 15% za  $C_{8h}$ . Na osnovu literaturnih navoda, u slučaju prihvatljive greške predviđanja za  $AUC_{0\rightarrow 8h}$ , predvidivost se može smatrati prihvatljivom.

Proističe da uz vremenski faktor srazmere, primenjeni korelacioni model može biti primenljiv u daljim fazama razvoja tableta, uz primenu predefinisane *in vitro* metode ispitivanja, kao predvidive, koja pruža mogućnost pretpostavljanja *in vivo* ponašanja preparata.

Poređenjem *in vivo* profila dobijenih na zdravim dobrovoljcima (iz raspoloživih publikacija) i *in vivo* eksperimentalno nađenih rezultata na kunićima, za komercijalni preparat (Phyllocontin 350 mg tablete, R-II) nađena je sličnost parametara  $AUC_{0\rightarrow \infty}$  i  $C_{max}$ .

Dobijene su visoke vrednosti korelacije, od 0.989 (za ispitivani interval 0-24h), odnosno za interval do 12h ( $R^2=0.996$ ), primenom regresione analize kod poređenja sličnosti kumulativnih frakcija %FD teofilina, izračunatih Wagner Nelson metodom, kod zdravih dobrovoljaca (prema dva literaturna izvora: Lin i sar., 1990; Möller i Langenbuher, 1982) i kod kunića.

Konstatovana je *in vitro/in vivo* korelacija nivoa A između *in vitro* brzina rastvaranja, posle primene vremenskog faktora srazmere i *in vivo* profila kod zdravih dobrovoljaca,  $R^2=0,986$  (kod Lin i sar, 1990) i  $R^2=0,985$  (za Möller i Langebucher, 1982).

Dobijeni rezultati ukazuju na opravdanost primene kunića kao životinjskog modela pri *in vivo* ispitivanjima u ranoj fazi razvoja farmaceutskog oblika, radi preliminarnih predviđanja *in vivo* ponašanja razvojnih formulacija.

Na osnovu svih dobijenih rezultata ispitivanja, prototip formulacija PF-III je izdvojena kao prihvatljiva za dalja ispitivanja, a kao referentni je odabran R-II, Phyllocontin 350 mg tablete.

Postavljen je preliminarni *in vitro* profil brzine rastvaranja PF-III formulacije: oslobađanje posle 2h: 20-40 % (*ciljana vrednost 30 %*) , 4h: 40-60 % (*ciljana vrednost 50 %*), 6h: 55-80 % (*ciljana vrednost 65 %*) i posle 8h: 75-95 % (*ciljana vrednost 85 %*).

Na osnovu procene greške predviđana za nađeni *in vitro/in vivo* korelacioni model, konstatovano je da se *in vitro* metoda po modelu Test 3 USP, može koristiti kao biorelevantna u daljim ispitivanjima i predviđanjima *in vivo* ponašanja formulacija sličnih sastava i mehanizama oslobađanja. Ustanovljeni parametri *in vitro* metode su: aparatura II USP sa rotirajućom lopaticom, brzina mešanja 50 rpm, pri temperaturi  $37 \pm 2$  °C, u 900 ml medijuma: veštački želudačni sok bez pepsina /0-1h i veštački crevni sok bez enzima /2-8h.

## **5. LITERATURA**

- [1] Abrahamsson B, Ungeli A. (2004). Chapter 7: Biopharmaceutical Support in Formulation Development. In Gibson M, *Pharmaceutical preformulation and formulation*, CRC Press LLC, USA, 2004: 2239-291.
- [2] AHFS Drug Information (2011), *American Society of Health – System Pharmacist*, USA.
- [3] Akhtar MF, Rabbani M, Sharif A, Akhtar B, Saleem A, Murtaza G. (2011). Formulation and characterization of modified release tablets containing isoniazid using swellable polymers. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(3): 250-259.
- [4] Ali J, Arora S, Ahuja A, Babbar A, Sharma R, Khar R. (2007). Formulation and Development of Floating Capsules of Celecoxib: In Vitro and In Vivo Evaluation. *AAPS Pharm Sci Tech*, 8(4): E1-E8.
- [5] Amidon GL, Lennernas H, Shah VP, Crison JR. (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res*, 12: 413-420.
- [6] Aronson JK, Hardman M, Reynolds DJ. (1992). ABC of monitoring drug therapy. Theophylline. *BMJ* 305: 1355-1358.
- [7] Bendas ER. (2009). Two Different Approaches for the Prediction of In Vivo Plasma Concentration-Time Profile from In Vitro Release Data of Once Daily Formulations of Diltiazem Hydrochloride. *Arch Pharm Res* 32(9):1317-1329.
- [8] Berridge J. (2009) PQLI: Current Status and Future Plans. *J Pharm Innov*, 4: 1-3.
- [9] Bhat A, Chowdary KPR, Shobharani RH, Suresh Babu AR. (2011). In-vivo studies of pulsatile-capsular, marketed conventional and active pharmaceutical drug delivery of theophylline by LC-MS/MS Method. *Pharmacology online*, 1: 49-58.
- [10] Bourne DWA. (2002). Chapter 3: Pharmacokinetics. In: Banker S, Rhodes C eds. *Modern Pharmaceutics 4<sup>th</sup> edition*. NewYork: Marcel Dekker Inc, 77-101.
- [11] Brown PJ, Dusci LJ, Shenfield GM. (1983). Lack of Dose Dependent Kinetics of Theophylline. *Eur J Clin Pharmacol*, 24: 525-527.

- [12] Cardot JM, Beyssac E, Alric M. (2007). In vitro-In vivo Correlation: Importance of Dissolution in IVIVC. *Dissolution Technologies*, February 2007: 15-19.
- [13] CardotJ-M. (2007a). Introduction to the *In vitro* – *In vivo* Correlation (IVIVC). Post-Conference Workshop organized by Informa Life Sciences, 25 May, Budapest.
- [14] Cardot JM, Davit BM. (2012). In vitro – In vivo correlations: Tricks and Traps. *The AAPS Journal*, 14(3): 491-499.
- [15] CDER. (1997). Guidance for Industry: Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation and Application of InVitro / InVivo Correlations.
- [16] CDER. (2003). Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products – General Consideration.
- [17] CDER. (2004). Guidance for Industry PAT – A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing and Quality Assurance, September 2004.
- [18] CDER. (2007). Guidance for Industry and Review Staff Target Product Profile – A Strategic Development Process Tool, Draft, March 2007.
- [19] CDER, FDA. (2011). Quality by Design for ANDAs: An Example for Modified Release Dosage Forms. [www.FDA.gov/HowDrugsAreDevelopedandApproved](http://www.FDA.gov/HowDrugsAreDevelopedandApproved).
- [20] CDER, FDA. (2012). Quality by Design for ANDAs: An Example for Immediate-Release Dosage Forms. [www.FDA.gov/HowDrugsAreDevelopedandApproved](http://www.FDA.gov/HowDrugsAreDevelopedandApproved).
- [21] Charoo NA., Shamsheer AA., Zidan AS., Rahman Z. (2012). Quality by Design approach for formulation development: A case study of dispersible tablets. *Int J Pharm*, 423: 167-178.
- [22] Chiou WL, Jeong HY, Chung SM, Wu TC. (2000). Evaluation of using dogs as an animal model to study the fraction of oral dose absorbed of 43 drugs in humans. *Pharma Res*, 17(2): 135-140.
- [23] Chopra S, Patil GP, Motwani SK. (2007). Release modulating hydrophilic matrix system of losartan potassium: Optimization of formulation using statistical experimental design. *Eur J Pharm Biopharm*, 66: 73-82.

- [24] Colombo P, Bettini R, Santi P, De-Ascentiis A, Pepas NA. (1996). Analysis of the swelling and release mechanisms from drug delivery systems with emphasis on drug solubility and water transport. *J Control Release*, 39: 231-237.
- [25] Colorcon.(2010). Latest on Methocel® matrices. Solid Dose Design Seminar: Delivering Across the product development value chain. *Dosage form design Seminar from Colorcon*, 13-14, April, 2010, Belgrade, Serbia.
- [26] Cook J, Addicks W, Wu YH. (2008). Application of the Biopharmaceutical Classification System in Clinical Drug Development - An Industrial View. *The AAPS Journal*, 10 (2): 306-310.
- [27] Costa P, Sousa-Lobo J. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci*, 13: 123-133.
- [28] Cotgreave IA, Caldwell J. (1983) Physicochemical plasma pharmacokinetics of theophylline and ethylenediamine after the administration of aminophylline to man. *J Pharm Pharmacol*, 35: 378-382.
- [29] Cotgreave IA, Caldwell J. (1985) Comparative pharmacokinetics of theophylline and ethylenediamine following single and repeated doses of a sustained release aminophylline to volunteers. *J Pharm Pharmacol*, 37: 618-621.
- [30] Das NG, Das SK. (2004) Development of Mucoadhesive Dosage Forms of Buprenorphine for Sublingual Drug Delivery. *Drug Dev* 11(2): 89-95.
- [31] Davis S, Illum L, Hinchcliffe M. (2001). Gastrointestinal transit of dosage forms in the pig. *J Pharm Pharmacol*, 53: 33-39.
- [32] Davis B., Lundsberg L., Cook G. (2008). PQLI Control Strategy Model Concepts. *J Pharm Innov*, 3: 95-104.
- [33] Delvadia PR, Barr WH, Karnes HT. (2012). A biorelevant in vitro release / permeation system for oral transmucosal dosage forms. *Int J Pharm* . 430: 104-113.
- [34] Deng H, Vass S, Tiwari S, Cabelka T, Faham A, Farrell T, Rajabi-Siahboomi AR. (2011). Application of QbD Principles to the Formulation of Extended Release Theophylline Matrix Tablets. *Poster on CRS Annual Meeting and Exposition* , Maryland 2011, www.colorcon.com.

- [35] Design of Experiment DOE in Engineering Statistics Handbook, N/ST/SEMATECH e-Handbook of statistical methods, April 2012, <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook>.
- [36] Dickinson P, L W, Stott P, Townsend A, Smart J, Ghahramani P, Hummet T, Billett L, Behn S, Gibb RC, Abrahamsson B. (2008). Clinical Relevance of Dissolution Testing in Quality by Design. *The AAPS Journal*, 10(2): 280-290.
- [37] Dokoumetzidis A, Macheras P. (2006). A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System. *Int J Pharm*, 321:1-11.
- [38] Dokoumetzidis A, Macheras P. (2008). IVIVC of controlled release formulations: Physiological-dynamical reasons for their failure. *J Cont Release*, 129: 76-78.
- [39] Donovan J, Brown P. (2006). Blood Collection. In: *Current Protocols in Immunology*. USA, John Wiley & Sons. Inc 1.7.1.-1.7.9.
- [40] Dow Chemical Company. (2009). Using methocel cellulose eters for controlled release of drugs in hydrophilic matrix systems, <http://www.dow.com7PublishedLiterature/dh>, preuzeto februar, 2009.
- [41] Draganoiu E, Muca B, Stansbrey A, Luo H, Wilber W, Guo H. (2005). Effect of Carbomer and hydroxypropyl methylcellulose combination on drug release from matrix tablets. *Eur. J. Pharm. Sci.* 25S1, S222 - S223 (2005).
- [42] D'Souza SS, Lozano R, Mazock S, Gray V. (2010). AAPS Workshop on the Role of Dissolution in QbD and Drug Product Life Cycle: A Commentary. *Dissol Technology*, 11 (November): 41-45.
- [43] Dunne A, OHara T, Devane J. (1997). Level A in vitro in vivo correlation: nonlinear models and statistical methodology. *J Pharm Sci*, 86:1245-1249.
- [44] El-Yazigi A, Sawchuk R. (1981). Theophylline absorption and disposition in rabbits: oral, intravenous and concentration dependent kinetic studies. *J Pharm Sci*, 70: 452-456.
- [45] El-Yazigi A, Sawchuk R. (1985). In Vitro-In Vivo correlation and Dissolution Studies with Oral Theophylline Dosage Forms. *J Pharm Sci* 74(2): 161-164,



- [46] EMEA (1998). Committee for veterinary medicinal product. Diprophylline-Summary Report. EMEA/MRL/386/98-FINAL. April 1998.
- [47] EMEA/CPMP/ICH/367/96. (2000a). Note for guidance specification: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Product: chemical drug substances, May 2000.
- [48] EMEA / CPMP. (2000b). Note for Guidance on quality of modified release products: A. oral dosage forms; B: transdermal dosage forms.
- [49] EMEA/CHMP/167068/2004-ICH. (2009). ICH Topic Q8(R2) Pharmaceutical Development, June 2009.
- [50] EMA/CPMP/EWP/QWP/1401/98 (2010). Guideline on the investigation of bioequivalence, January 2010.
- [51] EMA/INS/GMP/79766/2011. (2011a). Quality Risk Management (ICH Q9), January 2011a.
- [52] EMA/INS/GMP/79818/2011. (2011b). Pharmaceutical Quality System (ICH Q10), January 2011b.
- [53] Emami J. (2006). In vitro – In vivo Correlation: From Theory to Application. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 9 (2): 169-189.
- [54] Emeje M, John-Africa L, Kunle O, Ofoefule S. (2012). Eudraginated polymer blends: A potential oral controlled drug delivery system for theophylline. *Acta Pharm*, 62: 71-82.
- [55] EP 0 284 849 B1, Sustained release tablets on the basis of high molecular weight HPMC and a process for their manufacture. Lek, tovarna farmacevtskih in kemicnih izdelkov Ljubljana, 09.03.1988. [www.freepatentsonline.com/EP0284849.html](http://www.freepatentsonline.com/EP0284849.html)
- [56] Eroglu H, Bural-Bozkurt N, Uma S, Oner L. (2011) Preparation and In vitro / In vivo Evaluation of Microparticle Formulations Containing Meloxicam. *AAPS PharmSciTech*, DOI: 10.1208/s12249-011-9718-7.
- [57] Flaten GR, Ferreira AP, Bellamy L, Frake P. (2012). PAT within the *QbD* Framework: Real-Time End Point Detection for Powder Blends in Compliant Environment. *J Pharm Innov*, 7: 38-45.

- [58] Ford JL, Rubinstein MH, Hogan J. (1985a). Propranolol hydrochloride and aminophylline release from matrix tablets containing hydroxypropyl methylcellulose, *Int J Pharm*, 24: 339-350.
- [59] Ford JL, Rubinstein MH, Hogan J. (1985b). Formulation of sustained release promethazine hydrochloride tablets using HPMC matrices, *Int J Pharm*, 24: 327-338.
- [60] Ford JL, Rubinstein MH, McCaul F, Hogan J, Edgar P. (1987). Importance of drug type, tablet shape and added diluents on drug release from hydroxypropylmethylcellulose matrix tablets, *Int J Pharm*, 40: 223-234.
- [61] Furlanetto S, Cirri M, Maestrelli F, Corti G, Mura P. (2006). Study of formulation variables influencing the drug release rate from matrix tablets by experimental design. *Eur J Pharm Biopharm*, 62: 77-84.
- [62] Gao P, Skoug JW, Nixon PR, Ju TR, Stemm NL, Sung KC. (1996). Swelling of hydroxypropyl methylcellulose matrix tablets. 2. Mechanistic study of the influence of formulation variables on matrix performance and drug release. *J Pharm Sci*, 85: 732-740.
- [63] Garcia T, Cool G, Nosal R. (2008). PQLI Key Topics – Criticality, Design Space and Control Strategy. *J Pharm Innov*, 3: 60-68.
- [64] Ghimire M, McInnes FJ, Watson DG, Mullen AB, Stevens HN. (2007). In-vitro-in-vivo correlation of pulsatile drug release from press-coated formulations: A pharmacoscintigraphic study in the beagle dog. *Eur J Pharm Biopharm*, 67: 515-523.
- [65] Ghimire M, Hodges LA, Band J, O'Mahony B, McInnes FJ, Mullen AB, Stevens HN. (2010). In-vitro and in-vivo erosion profiles of hydroxypropylmethyl cellulose (HPMC) matrix tablets. *J Control Release*, 147: 70-75.
- [66] Ghorab M, Khafagy E, Kamel M, Gad S. Formulation, characterisation and comparative in vitro in vivo evaluation of sustained release theophylline tablets. *Int J Pharm Pharm Sci*, 4(3): 721-728.
- [67] Glodek M, Liebowitz S, McCarthy R, McNally G, Oksanen C, Schultz T, Sundararajan M, Vorkapich R, Vukovinsky K, Watts C, Millili G. (2006). Process robustness – A PQRI white paper. *Pharm Eng*, 26 (6): 1-11.

- [68] Gohel M, Jani GK; Amin AF, Patel KV, Gupta SV. (1997). Application of classical experimental design for the development of theophylline microspheres. *Journal of Controlled Release*, 45: 265-271.
- [69] Gohel M, Delvadia RR, Parikh DC, Zinzuwadia MM, Soni CD, et al. Simplified Mathematical Approach for Back Calculation in Wagner-Nelson Method. (2005). *Pharm Rev*, 3(2).
- [70] Gundert-Remy, Hildebrandr R, Hengen N, Weber W. (1983) Non-Linear Elimination processes of Theophylline. *Eur J Clin Pharmacol*, 24: 71-78.
- [71] e-Handbook of statistical methods, April 2012, <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook>
- [72] Hayashi T, Kanbe H, Okada M, Suzuki M, Ikeda Y, Onuki Y, Kaneko T, Sonobe T. (2005). Formulation study and drug release mechanism of a new theophylline sustained-release preparation. *Int.J. Pharm*, 304: 91- 101.
- [73] Hayashi T, Kanbe H, Okada M, Kawase I, Ikeda Y, Onuku Y, Kaneko T, Sonobe T. (2007). In vitro and in vivo sustained-release characteristics of theophylline matrix tablets and novel cluster tablets. *Int J Pharm*, 341: 105-113.
- [74] He H, Yang R, Tang X. (2010). In vitro and in vivo evaluation of fenofibrate solid dispersion prepared by hot-melt extrusion. *Drug Dev Ind Pharm*, 36(6): 681-687.
- [75] Hendeles L. (1985). Update on the Pharmacodynamic and Pharmacokinetics of Theophylline. *Chest*, 88(2): 103S-111S.
- [76] Herzfeldt CD, Hellenbrecht D, Zimmer A, Brehm R. (1989). Poor Availability of Sustained-Release Theophylline CAused by pH-Dependent Biphasic Release. *Acta Pharm Technol*, 35(2): 79-81.
- [77] Huang YB, Tsai YH, Yang WC, Chang JS, Wu PC, Takayama K. (2004). Once-daily propranolol extended-release tablet dosage form: formulation design and in vitro/in vivo investigation. *Eur J Pharm Biopharm*, 58: 607-614.
- [78] Huang YB, Tsai YH, Lee SH, Chang JS, Wu PC. (2005). Optimization of pH-independent release of nifedipine hydrochloride extended-release matrix tablets using response surface methodology. *Int J Pharm*, 289: 87-95.

- [79] Hulbert MH, Felly LC, Inman EL, Johnson AD, Kearney AS, Michaels J, Mitchell M, Zour E. (2008). Risk Management in the Pharmaceutical Product Development Process. *J Pharm Innov*, 3: 227-248.
- [80] Hurwitz A, Karim A, Burns TS. (1987) Theophylline absorption from sustained-release products: comparative steady-state bioavailability of once daily Theo-Dur, Theo-24 and Uniphyl. *J Clin Pharmacol*, 27(11): 855-861.
- [81] Ikegami K, Tagawa K, Osawa T. (2006). Bioavailability and In Vivo Release Behavior of Controlled-Release Multiple-Unit Theophylline Dosage Forms in Beagle Dogs, Cynomolgus Monkeys and Gottingen Minipigs. *J Pharm Sci*, 95 (9): 1888-1895.
- [82] Islam S, Khan F, Jalil R. (2010). Sustained Release Theophylline Matrix Tablets Prepared by Direct compression I: Effect of Hydrophobic Excipients. *Ban Pharm Journal*, 13(1): 3-8.
- [83] Jain H, Joshi K, Gediya S, Sutariya V, Shah H, Pasha HS. (2011). In vitro in vivo correlation (IVIVC): A Review. *Int J Imperial Pharmaceutics Cosmetology* www.imperialjournals.com .1: 1-7.
- [84] Jantzen GM, Robinson JJ. (2002). Chapter 15: Sustained-and Controlled-Release Drug-Delivery Systems. In: Banker GB, Rhodes CT, *Modern Pharmaceutics, fourth edition*, Marcel Dekker, Inc, New York, 2002: 503-530.
- [85] Jiang W., Yu LX. (2009). Chapter 38: Modern Pharmaceutical Quality Regulations-Question based Review in Qui Y, Chen Y, Zhang G, *Developing Solid Oral dosage Forms: Pharmaceutical Theory & Practice*. Elsevier USA, 2009: 885-901.
- [86] Ju RTC, Nixon PR, Patel MV. (1995a). Drug release from hydrophilic matrices I. New scaling laws for predicting polymer and drug release based on the polymer disentanglement concentration and the diffusion layer. *J Pharm Sci*, 84(12): 1455-1463.
- [87] Ju RTC, Nixon PR, Patel MV, Tong DM. (1995b). Drug release from hydrophilic matrices I. Mathematical model based on polymer disentanglement concentration and the diffusion layer. *J Pharm Sci*, 84(12): 1455-1463.

- [88] Kararli T. (1995). Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharmaceutics Drug Disposition*, 16: 351-380.
- [89] Karasulu HY, Ertan G, Köse T. (2000). Modeling of theophylline from different geometrical erodible tablets. *Eur J Pharm Biophar*, 49: 177-182.
- [90] Karasulu HY, Apaydin S, Ince I, Tuglular I. (2006). Theophylline granule formulation prepared by wet granulation method: comparison of in vitro dissolution profiles and estimation of in vivo plasma concentration. *European Journal of Drug Methabolism and Pharmacokinetics*, 31(4):291-298.
- [91] Keir S, Page C. (2008). The rabbit as a model to study asthma and other lung diseases. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 21: 721-730.
- [92] Khan GM, Zhu JB. (1999). Studies on Drug Release Kinetics from Ibuprofen-Carbomer Hydrophilic Matrix Tablets: Influence of co-Excipients on Release Rate of the Drug. *J. Contr.Release*, 57(2):197-203.
- [93] Khanna R, Agarwal SP, Ahuja A, (1997). Muco-adhesive buccal tablets of clotrimazole for oral candidiasis. *Drug Dev Ind Pharm*, 23: 831-837.
- [94] Kim, Fassihi. (1997). A new ternary polymeric matrix system for controlled drug delivery of highly soluble drugs: I. Diltiazem hydrochloride. *Pharm Res*, 14(10): 1415-1421.
- [95] Kiortsis S, Kachrimanis K, Broussali T, Malamataris S. (2005). Drug release from tableted wet granulations comprising cellulosic (HPMC or HPC) and hydrophobic component. *Eur. J. Pharm. Biopharm*, 59: 73-83.
- [96] Kissne CE. (1990). Comparative evaluation using in vitro dissolution tests of various sustained release theophylline preparations. *Acta Pharm Hung*, 60: 191-196.
- [97] Koranianiti E. (2011). Regulatory Assessment of Applications Containing QbD Elements, EU Perspective. Presentation 27 July 2011, Advisory Committee for Pharmaceutical Science and Clinical Pharmacology (ACPS-CP). Available at: <http://www.fda.gov>.
- [98] Kormeyer RW, Gurny R, Doelker E, Buri P, Peppas N. (1983). Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int J Pharm*, 15: 25-35.

- [99] Lepore J., Spavins J (2008). PQLI Design Space. *J Pharm Innov*, 3: 79-87.
- [100] Li S, Lin S, Daggy BP, Mirchandani HL, Chien YW. (2003) Effect of HPMC and Carbopol on the release and floating properties of Gastric floating Drug Delivery System using factorial design. *Int J Pharm* 253: 13-22.
- [101] Li CL, Kao YH, Chang HN. (2005). The use of hypromellose in oral drug delivery. *J Pharm Pharmacol*, 57: 533-546.
- [102] Lin SY, KAO YH, Chang HN. (1990). Preliminary Evaluation of the Correlation between In Vitro Release and In Vivo Bioavailability of Two Aminophylline Slow Release Tablets. *J Pharm Sci*, 79(4): 326-310.
- [103] Lindenberg M, Kopp S, Dressman J. (2004). 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*, 58: 265-278.
- [104] Lionberger RA, Lee SL, Lee LM, Raw A, Yu LX. (2008). Quality by Design: Concepts for ANDAs. *The AAPS Journal*, 10 (2): 268-276.
- [105] Lipka E, Amidon GL. (1999). Setting bioequivalence requirements for drug development based on preclinical data: optimizing oral drug delivery systems. *J Contr Release*, 62:41-49.
- [106] Löbenberg R, Kim JS, Amidon G. (2005). Pharmacokinetics of animal immediate release, a controlled release and a two pulse dosage form in dogs. *Eur J Pharm and Biopharm*, 60: 17-23.
- [107] Lubrizol, Pharmaceutical Polymers for Controlled Release Tablets and Capsules, *Pharmaceutical Bulletin* 30, May (2011a).
- [108] Lubrizol, Formulating Controlled Release Tablets and Capsules with Carbopol® polymers, *Pharmaceutical Bulletin* 31, May (2011b).
- [109] Lubrizol, Guidance document for processing Carbopol® polymers in Oral Solid Dosage Forms, May (2011c).
- [110] Lubrizol, Polimers for Pharmaceutical Applications, *Pharmaceutical Bulletin* 1, May (2011d)

- [111]Lunney PD, Cogdill RP, Drennen III JK. (2008). Innovation in Pharmaceutical Experimentation Part 1: Review of Experimental Design Used in Industrial Pharmaceutics Research and Introduction to Bayesian D-Optimal Experimental Design. *J Pharm Innov*, 3: 188-203.
- [112]Macha S, Yong CH, Darrington T, Davis MS, MacGregor T, Castles M, Krill SL. (2009) In Vitro-In Vivo Correlation for Nevirapine Extended Release Tablets. *Biopharm Drug Dispos*, 30: 542-550
- [113]Martindale, The Complete Drug Reference, 37th edition, London, Pharmaceutical Press, 2011
- [114]Modi VS, Thorat YS, Dhavale SC. (2010). Formulation and evaluation of controlled release delivery of tramadol hydrochloride using  $3^2$  full factorial design. *Int J Chem Tech Res*, 2(1): 669-675.
- [115]Midha KK, McKay G. (2009). Bioequivalence; Its History, Practice, and Future. *The AAPS Journal*, 11(4): 664-6700.
- [116]Milavetz G. (1987). Stability of theophylline elimination rate. *Clin Pharm Therap*, 41: 388-391.
- [117]Mirza T, Bykadi SA, Ellison CD, Yang Y, Davit BM, Khan DM. (2013). Use of In Vitro-In Vivo Correlation to Predict the Pharmacokinetics of Several Products Containing a BCS Class I Drug in Extended Release Matrices. *Pharm Res*, 30: 179-190.
- [118]Möller H, Langenbucher F. (1982). In vitro and in vivo Dissolution of some sustained Release Tablets of Theophylline. *Pharm Ind*, 44(10): 1065-1071.
- [119]Morris KR. (2007). Risked-based development and CMC question-based review: Asking the right questions for process understanding, control and filing. FDA Advisory Committe for Pharmaceutical Science. Available at: [http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/04/slides/2004-4052S1\\_12\\_Morris.ppt](http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/04/slides/2004-4052S1_12_Morris.ppt).
- [120]Munday DJ, Fassihi AR. (1995). In vitro –in vivo correlation studies on a novel controlled release theophylline delivery system and on Theo-Dur tablets. *Int J Pharm*, 118: 251-255.
- [121]Muschert S, Siepman F, Leclercq B, Carlin B, Siepman J. (2009). Prediction of drug release from ethylcellulose coated pellets. *J Control Release*, 135: 71-79.

- [122] Musko Z, Pintye-Hodi, Gaspar R, Pintye J, Szabo-Revesz P, Eros I, Falkay G. (2001). Study of in vitro and in vivo dissolution of theophylline from film-coated pellets. *Eur J Pharm Biopharm*, 51: 143-146.
- [123] Nainar S, Rajjah K, Angamuthu S, Prabakaran D, Kasibhatta R. (2012). Biopharmaceutical Classification System in In-vitro / In-vivo Correlation: Concept and Development Strategies in Drug Delivery. *Trop J Pharm Res*, 11(2): 319-329.
- [124] Nandy BC, Roy S, Mayumder B, Meena KC, Ahuja D, Makhija M, Jain S, Sharma S, Shrivastava A, Saxena P. (2011). In Vitro-In vivo Correlation: Application in pharmaceutical development of various dosage forms. *J Chem Pharm Res*, 3(5): 550-564.
- [125] Narasimhan B. (2001). Mathematical models describing polymer dissolution: consequences for drug delivery. *Adv. Drug. Del. Rev*, 48: 195-210.
- [126] Nosal R., Schultz T. (2008). PQLI Definition of Criticality. *J Pharm Innov*, 3: 69-78.
- [127] Nuwer MR, Browne TR, Dodson WE. (1990). Generic substitutions for antiepileptic drugs. *Neurology*, 40: 1647-1651.
- [128] Ozturk AG, Ozturk SS, Palsson BO, Wheatley TA, Dressman JB. (1990). Mechanism of release from pellets coated with an ethylcellulose-based film. *J Control Release*, 14: 203-213.
- [129] Papadopoulou V, Valsami G, Dokumetzidis A, Macheras P. (2008). Biopharmaceutics classification systems for new molecular entities (BCS – NMEs) and marketed drug (BCS-MD): Theoretical basis and practical examples. *Int J Pharm*, 361: 70-77.
- [130] Parojcic J, Duric Z, Jovanovic M, Ibric S. (2004). An Investigation into the Factors Influencing Drug Release from Hydrophilic Matrix Tablets Based on Novel Carbomer Polymers. *Drug Dev*, 11(1): 59-65.
- [131] Parojcic J, Ibric S, Djuric Z, Jovanovic M, Corrigan OI. (2007). An investigation into the usefulness of generalized regression neural network analysis in the development of level A in vitro-in vivo correlation. *Eur J Pharm Sci*, 30: 264-272.



- [132]Paterakis PG, Korakianiti ES, Dallas PP, Rekkas DM. (2002). Evaluation and simultaneous optimization of pellets characteristics using a 3<sup>3</sup> factorial design and desirability function. *Int J Pharm*, 248: 51-60.
- [133] Patient Information leaflet - PIL, Aminofilin tablete sa produženim oslobađanjem 350 mg Srbolek ad, Srbija: [www.alims.gov.rs/ciril/lekovi/pil/117-2008-12](http://www.alims.gov.rs/ciril/lekovi/pil/117-2008-12)
- [134]Patient Information leaflet - PIL, Phyllocontin® 350, tablets Purdue Pharma, Kanada in Product Monograph: [www.rxmed.com/b.main/b2.pharmaceutical/b2.1.monographs](http://www.rxmed.com/b.main/b2.pharmaceutical/b2.1.monographs).
- [135]Patient Information leaflet - PIL, Phyllotemp® retard 225mg tablets, Mundipharma, GmbH, Nemačka in: [www.epgonline.org/viewdrug.cgm/letter/P/Phyllotemp](http://www.epgonline.org/viewdrug.cgm/letter/P/Phyllotemp).
- [136]Patient Information leaflet – PIL, Aminophyllinum retard 350 mg tablete, Lek, Slovenija: [www.tegobe.com/vademecumi/lek/aminophyllinum.html](http://www.tegobe.com/vademecumi/lek/aminophyllinum.html).
- [137]Patient Information leaflet – PIL, Durofilin® kapsule sa produženim oslobađanjem, tvrde, 250mg, Zdravlje ad, Srbija: [www.alims.gov.rs/ciril/lekovi/pil/515-d-3073-09-001](http://www.alims.gov.rs/ciril/lekovi/pil/515-d-3073-09-001).
- [138]Patil RP. (2010). Process Robustness in Pharmaceutical Manufacturing. *Process validation*, november 4: 1-2. [www.askaboutvalidation.com/process-robustness-in-pharmaceutical-manufacturing](http://www.askaboutvalidation.com/process-robustness-in-pharmaceutical-manufacturing).
- [139]Perez-Marcos B, Ford JL, Armstrong DJ, Elliot PNC, Rostron C, Hogan JE. (1994). Release of Propranolol Hydrochloride from Matrix Tablets Containing Hydroxypropyl methylcellulose K4M and Carbopol 974. *Int. J. Pharm.* 111: 251-259.
- [140]Perez-Marcos B, Ford JL, Armstrong DJ, Elliot PNC, Rostron C, Hogan JE. (1996). Influence of the pH on the Release of Propranolol Hydrochloride from Matrices Containing Hydroxypropyl methylcellulose K4M and Carbopol 974. *J. Pharm. Sci.* 85: 330-334.
- [141]Petričević S. (2010). Farmakokinetika Aminofilina kod kunića, posle oralne primene različitih formulacija tableta sa produženim oslobađanjem aktivne

supstancije. Univerzitet u Beogradu, Fakultet Veterinarske medicine, *Doktorska disertacija* (2010).

- [142] Phyllocontin 350 sustained release tablets, Purdue Pharma Canada, Product informations: <http://www.rxmed.co/pharmaceutical>
- [143] Phyllcontin forte continus tablets 350 mg, Napp Pharmaceuticals Ltd, UK, Electronic medicines compendium: <http://www.napp.co.uk>.
- [144] Phyllocontin continus 225mg prolonged release tablets, Mundipharma Pharmaceuticals Ltd: <http://www.medicines.ie/medicine/5067/SPC/Phyllocontin+continius+tablets/>
- [145] Poter C. (2009). PQLI Application of Science- and Risk –based Approaches (ICH Q8, Q9, and Q10) to Existing Products. *J Pharm Innov*, 4: 4-23.
- [146] Pradhan R, Budhathoki U, Thapa P. (2008). Formulation of once a day controlled release tablet of indomethacin based on HPMC-Mannitol. *J Sci Eng Tech*, 1(5): 55-67.
- [147] Prudat-Christiaens C, Arnaud P, Allain P, Chaumeil JC. (1996) Aminophylline bioadhesive tablets attempted by wet granulation. *Int J Pharm*, 141: 109-116.
- [148] Puchun L, Tzuchi R, Yihong Q, (2005). Chapter 4: Diffusion Controlled Drug Delivery Systems. In: Xiaoling L, Bhaskara R, *Design of Controlled Release Drug Delivery Systems* McGraw-Hill Companies, Inc, 2006: 107-138.
- [149] Quadir MA, Rahman MS, Karim MZ, Akter S, Awkat MT, Reza MS. (2003) Evaluation of hydrophobic materials as matrices for controlled-release drug delivery. *Pak J Pharm Sci*, 16(2): 17-28.
- [150] Qui Y. (2009). Chapter 17: In vitro-In vivo correlations: Fundamentals, Development Consideration, and Application. In: Qui Y, Chen Y, Zhang G, *Developing Solid Oral Dosage Forms, Pharmaceutical Theory and Practice*, first edition, USA: Elsevier, 2009: 379-406.
- [151] Qiu Y, Zhang G. (2009). Chapter 21: Development of Modified-Release Solid Oral Dosage Forms. In: Qui Z, Chen Z, Zhang G, *Developing Solid Oral Dosage Forms, Pharmaceutical Theory and Practice*, first edition, USA: Elsevier, 2009: 501-518.

- [152] Ramana V. (2001). Regulatory perspectives on in vitro (dissolution) and in vivo (bioavailability) correlation. *J Controll Release*, 72: 127-132.
- [153] Rasool F, Ahmad M, Khan H, Akhtar N, Murtaza G. (2010). The effect of binders on the bioavailability of ofloxacin tablets in animal model. *Acta Poloniae-Pharmaceutica – drug Research*, 67(2): 185-189
- [154] Restivo G. (2009). Process Analytical Technology (PAT) / Quality by Design (QbD): Integrated Systems in the Future Pharma Business Landscape. *Presentation Sept 14, 2009. ISPE.*
- [155] Rinaki E, Valsami G, Macheras P. (2003). The power law can describe the entire drug release curve from HPMC-based matrix tablets: a hypothesis. *Int J Pharm*, 255: 199-207.
- [156] Robertson JA, Tiwari SB, Cabelka TD. (2012). Applying Quality by Design, for Extended-Release Hydrophilic Matrix Tablets. *PTE*, November 2012: 33-37.
- [157] Sabnis S, Adeyeye M. (1998). Controlled-Release Hydrophilic Tablets for Individualized Theophylline Therapy. *Drug Dev Ind Pharm*, 25(2): 187-196.
- [158] Sakuma S, Ogura R, Masaoka Y, Kataoka M, Tanno F, Kokubo H, Yamashita S. (2009). Correlation between In Vitro Dissolution Profiles from Enteric-Coated Dosage Forms and In Vivo Absorption in Rats for High-Solubility and High-Permeability Model drugs. *J Pharm Sci*, 98(11): 4141- 4152.
- [159] Scheubel E, Adamy L, Hoffart V, Cardot JM. (2010). Selection of the most suitable dissolution method for an extended release formulation based on IVIVC level A obtained on cynomolgus monkey. *Drug Dev Ind Pharm* 36(11): 1320-1329.
- [160] Selen A, Cruanes MT, Mullertz A, Dickinson PA, Cook JA, Polli JE. (2010). Meeting Report: Applied Biopharmaceutics and Quality by Design for Dissolution/Release Specification Setting: Product Quality for Patient Benefit. *The AAPS Journal*, 12(3): 465-472.
- [161] Shah HJ, Subbaiah G, Patel DM, Patel CN. (2009). In Vitro-In Vivo Correlation of Modified Release Dosage Form of Lamotrigine. *Biopharm Drug Dispos*, 30: 524-531.

- [162] Sharif A, E-Rabbant M, Akhtar MF, Akhtar B, Saleem A, Farzana K, Usman A, Murtaza G. (2011). Design and evaluation of modified release bilayered tablets of flurbiprofen. *Adv Clin Exp Med*, 20(3): 343-349.
- [163] Shiohira H, Fujii M, Koizumi N, Kondoh M, Watanabe Y. (2009). Novel chronotherapeutic rectal aminophylline delivery system for therapy of asthma. *Int J Pharm*, 379: 119-124.
- [164] Siepmann J, Lecomte F, Bodmeier R. (1999). Diffusion-controlled drug delivery systems: calculation of the required composition to achieve desired release profiles. *J Control Release*, 60: 379-389.
- [165] Siepmann J, Podual K, Sriwongjanya M, Peppas NA, Bodmeier RA. (1999). A New Model Describing the Swelling and Drug Release Kinetic from hydroxypropylmethyl cellulose Tablets. *J Pharm Sci*, 88(1): 65-72.
- [166] Siepmann J, Peppas NA. (2001). Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropylmethylcellulose (HPMC). *Adv. Drug. Del. Rev.* 48: 139-157.
- [167] Simons KJ, Frith EM, Simons FE. (1982). Dissolution and Bioavailability Studies of Whole and Halved Sustained-Release Theophylline Tablets. *J Pharm Sci*, 71(5): 505-511.
- [168] Simons KJ, Simons FE, Plett KD, Scerbo C. (1984). Dissolution studies of some sustained-release theophylline dosage forms. *J Pharm Sci*, 73(7): 939-942.
- [169] Smart JD, Barnes MS, Norris MJ. (1992). An in-vitro comparison of controlled release aminophylline tablets: Phyllocontin continues and Pecram. *J Pharm Pharmacol*, 44: 623-625.
- [170] Smith P. (2009). Hydrophilic Matrices for Extended Drug Release: Best Practices for Formulation Design. *Modified Release Forum organized by Colocron*, Sept 15-16, 2009, Budapest.
- [171] Sommers DK, Wyk MW, Meyer EC, Snyman JR, Moncriefe J. (1992). The absorption characteristics of six sustained-release theophylline preparations. *SAMJ*, 81(1): 20-22.
- [172] Souliman S, Cardot JM, Denis S, Alric M. (2007). Investigation of the Biopharmaceutical Behavior of Theophylline Hydrophilic Matrix Tablets Using

USP Method and an Artificial Digestive System. *Drug Dev Ind Pharm*, 33: 475-483.

- [173]Streubel A, Siepmann J, Peppas NA, Bodmeier R. (2000). Bimodal drug release achieved with multi-layer matrix tablets: transport mechanisms and device design. *J Control Release*, 69:455-468.
- [174]Streubel A, Siepmann J, Bodmeier R. (2003) Floating matrix tablets based on low density foam powder: effects of formulation and processing parameters on drug release. *Eur J Pharm Sci* 18: 37-45.
- [175]Sweetman S, editor. MartinDale: The complete drug reference, 35<sup>th</sup> ed. London, Pharmaceutical Press. (2007). electronic version.
- [176]Takano R, Kataoka M, Yamashita S. (2012). Integrating drug permeability with dissolution profile to develop IVIVC. *Biopharm Drug Dispos*, DOI: 10.1002/bdd.
- [177]Tamilvanan S, Babu RV, Nappinai A, Sivaramakrishnan G. (2011). In vitro and in vivo evaluation of hydrophilic and hydrophobic polymers-based nicorandil-loaded peroral tablet compared with its once-daily commercial sustained-release tablet. *Drug Dev Ind Pharm* 37(4): 436-445.
- [178]Tanikawa K, Matsumoto Y, Matsuzaki T, Matsumoto M, Fukuoka M, Noguchi S, Goshima T. (1999). Population Pharmacokinetic Analysis of Theophylline: Relationship between Serum Concentrations and Clinical Effects in Therapeutic Drug Monitoring. *Yakugaku Zasshi*, 119(11): 861-867.
- [179]Tong C, D'Souza SS, Parker JE, Mirza T. (2007). Commentary on AAPS Workshop Dissolution Testing for the Twenty-first Century: Linking Critical Quality Attributes and Critical Process Parameters to Clinically Relevant Dissolution. *Pharm Res*, 24(9): 1603-1607.
- [180]Torrent J, Izquierdo I, Barbanoj MJ, Obach R, Nomen M, Jane F, (1988). Theophylline pharmacokinetics following single and repeated administration of slow-release capsules. *Eur J Drug Metab Pharmacokinetics*, 3(4): 225-230.
- [181]Toutain PL, Bousquet – Melou (2004). *Bioavailability and its assessment*. *J vet Pharmacol Therap*, 27: 455-466.
- [182]Trivedi B. (2012). Quality by Design (QbD) in Pharmaceuticals. *Int J Pharm Pharm Sci*, 4(1): 17-29.

- [183]Tse FL, Szeto DW. (1982). Theophylline bioavailability in the dog. *J Pharm Sci*, 71: 1301-1303.
- [184]Tulain U, Rahman N. (2008). Comparative bioavailability and in vitro in vivo correlation of two sustained release brands of theophylline: tablets and pellets. *Pak J Pharm Sci*, 21(2) 131-138.
- [185]USP-32; NF-27. In vitro and in vivo evaluation of dosage forms. The United States Pharmacopeia / The National Formulary, United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, USA.
- [186]Varshosaz J, Ghafghazi T, Raisi A, Falamarzian M. (2000). Biopharmaceutical characterization of oral theophylline and aminophylline tablets. Quantitative correlation between dissolution and bioavailability studies. *Eur J Pharm Biopharm*, 50: 301 – 306.
- [187]Wagner JG, Nelson E. (1964). Kinetic analysis of blood levels and urinary excretion in the absorptive phase after single doses of drug. *J Pharm Sci*, 53: 1392-1403.
- [188]Wagner JG. (1986). Estimation of theophylline absorption rate by means of the Wagner-Nelson equation. *J Allergy Clin Immunol*, 78: 681-688.
- [189]WHO Technical Report Series 937 (2006): Annex 8 – Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for WHO Model List of Essential Medicines immediate-release, solid oral dosage forms, edit by WHO, Geneva 2006: 391-438.
- [190]Wong LP, Gilligan CA, Li-Wan PA. (1992). Preparation and characterization of sustained-release ibuprofen-cetostearyl alcohol spheres. *Int J Pharm*, 83: 95-114.
- [191]Woodcock J., (2004). The concept of pharmaceutical quality. *Am Pharm Rev*, 7: 10-15.
- [192]Yasir M, Asif M, Kumar A, Aggarwal. (2010). Biopharmaceutical Classification System: An Account. *Int J PharmTech Res*, 2(3): 1681-1690.
- [193]Yin L-F, Huang S-J, Jiang S-G, Zhao C-J, Pei Z-Q. (2011). In vitro and in vivo evaluation of levofloxacin sustained-release capsules. *Drug Dev Ind Pharm*, 36(6): 681-687.

- [194] Yu LX, Amidon GL, Polli J, Zhao H, Mehta MU, Conner DP, Shah VP, Lesko LJ, Chen ML, Lee V, Hussain A. (2002). Biopharmaceutics Classification System: The Scientific Basis for Biowaiver Extensions. *Pharm Res*, 19(7): 921-925.
- [195] Yu LX. (2008). Pharmaceutical Quality by Design: Product and Process Development, Understanding, and Control. *Pharm. Res*, 25(4): 781-791.
- [196] Yu LX. (2012). Pharmaceutical Quality by Design: Product, Process Development - understanding and Control, Presentation May 27, 2012. FDA Advisory Committee for Pharmaceutical Science. Available at: <http://www.fda.gov>.
- [197] Yu Z, Schwartz J, Sugita E. (1996). Theophylline controlled-release formulations: in vivo-in vitro correlations. *Bipharm Drug Desp*, 17: 259-272.
- [198] Yuksel N, Kanik A, Tamar B. (2000). Comparison of in vitro dissolution profiles by Anova-based model-dependent and -independent methods. *Int J Pharm*, 209: 57-67.
- [199] Zhou H, Seitz K. (2009). Chapter 16: In Vivo Evaluation of Oral Dosage Form Performance – Animal Species Selection. In: Qui Z, Chen Z, Zhang G, *Developing Solid Oral Dosage Forms, Pharmaceutical Theory and Practice*, first edition, USA: Elsevier, 2009: 366-368.
- [200] Zhu H, Zhou H, Seitz K. (2009). Chapter 15: Bioavailability and Bioequivalence. In Qui Y, Chen Y, Zhang G, *Developing Solid Oral Dosage Forms, Pharmaceutical Theory and Practice*, first edition, USA: Elsevier, 2009: 341-364.
- [201] Zhu X-J, Yuan W, Li P, Liu X, He J-Q. (2010). Pharmacokinetics of a novel nifedipine and pH-sensitive N-succinyl chitosan/alginate hydrogel bead in rabbits. *Drug Dev Ind Pharm* 36(12): 1463-1468.
- [202] Zuleger. S, Lippold BC. (2001). Polymer particle erosion controlling drug release.I. Factors influencing drug release and characterization of the release mechanism. *Int. J. Pharm.* 217: 139-152.
- [203] Zuleger. S, Fassihi R, Lippold BC. (2002). Polymer particle erosion controlling drug release.I. Factors influencing drug release and characterization of the release mechanism. *Int. J. Pharm.* 247, 23-37.

## **BIOGRAFIJA AUTORA**



## **BIOGRAFIJA AUTORA**

mr. sci Aleksandra Petrović rođena je u Beogradu gde je završila farmaceutski fakultet sa prosečnom ocenom 9,57, a potom i poslediplomske studije iz farmaceutske tehnologije i stekla zvanje magistra farmaceutskih nauka odbranom magistarskog rada iz oblasti matriks sistema sa produženim oslobađanjem lekovite supstance 2002 godine. Bila je zaposlena u Institutu za istraživanje i razvoj Galenika a.d., najpre na mestu saradnika, a potom kao rukovodilac laboratorije za čvrste oblike, odnosno kao pomoćnik direktora Centra za farmaceutske tehnologije. Od jula 2007. godine zaposlena je u kompaniji PharmaSwiss d.o.o., Beograd, najpre u zvanju koordinatora za razvoj, a potom kao rukovodilac službe za razvoj i transfer tehnologija.

Radila je na poslovima razvoja novih ili unapređenju postojećih čvrstih lekovitih oblika (prahova, granulata, kapsula, tableta, film tableta, dražeja, oblika sa modifikovanim oslobađanjem) za humanu, veterinarsku primenu, preparata na bazi lekovitog bilja i dijetetskih proizvoda, kao i poslovima transfera – novih, optimizovanih ili licencnih tehnologija u proizvodnji uz sve aktivnosti koje obuhvataju ovu fazu, od pripreme dokumentacije, preko praćenja u proizvodnji i sprovođenja validacije procesa. Učestvovala je u različitim projektima na nivou firme (iz oblasti lekovitog bilja, proizvodnje efervescentnih proizvoda, nove fabrike čvrstih oblika), pripremi stručnih predavanja i edukacija, izložbama pronalazača (osvojene 2 srebrne i 1 zlatna plaketa), na projektima (4 projekta) kod Republičkog i Saveznog Ministarstva za nauku i zaštitu životne sredine.

## **OBJAVLJENI RADOVI I SAOPŠTENJA**

mr. sci Aleksandra Petrović je autor ili koautor 10 naučnih radova objavljenih u međunarodnim i domaćim časopisima i 61 saopštenja prezentovanog na međunarodnim i domaćim skupovima, kao i jedne patentne prijave

## **PRILOZI / IZJAVE**

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Александра Петровић

број уписа  /

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Примена концепта дизајна квалитета у раној фази фармацеутског развоја  
таблета са модификованим ослобађањем активне супстанце**

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

Потпис докторанда

У Београду, 17.10.2013.

Александра Петровић

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Александра Петровић \_\_\_\_\_

Број уписа \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Наслов рада Примена концепта дизајна квалитета у раној фази фармацеутског развоја таблета са модификованим ослобађањем активне супстанце \_\_\_\_\_

Ментор Проф др Зорица Ђурић \_\_\_\_\_

Потписани \_\_\_\_\_ Александра Петровић \_\_\_\_\_

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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 докторанда

У Београду, 17.10.2013. \_\_\_\_\_

Александра Петровић

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

**Примена концепта дизајна квалитета у раној фази фармацеутског развоја  
таблета са модификованим ослобађањем активне супстанце**

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 17.10.2013.

Александар Вељковић