Razvoj biorelevantne metode ispitivanja in vitro oslobađanja metaksalona iz tableta trenutnog oslobađanja

Vuletić, Lucija

Doctoral thesis / Disertacija

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:667584

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-23**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Lucija Vuletić

RAZVOJ BIORELEVANTNE METODE ISPITIVANJA *IN VITRO* OSLOBAĐANJA METAKSALONA IZ TABLETA TRENUTNOG OSLOBAĐANJA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2019.

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Lucija Vuletić

RAZVOJ BIORELEVANTNE METODE ISPITIVANJA *IN VITRO* OSLOBAĐANJA METAKSALONA IZ TABLETA TRENUTNOG OSLOBAĐANJA

DOKTORSKI RAD

Mentori:

dr. sc. Biserka Cetina-Čižmek

prof. dr. sc. Jelena Filipović-Grčić

Zagreb, 2019.

University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Lucija Vuletić

BIORELEVANT DISSOLUTION METHOD DEVELOPMENT FOR METAXALONE IMMEDIATE RELEASE TABLETS

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Biserka Cetina-Čižmek, PhD

Prof. Jelena Filipović-Grčić, PhD

Zagreb, 2019.

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija.

ZAHVALA

Završavajući ovo poprilično izazovno i vrijedno iskustvo u mom životu, želim se zahvaliti svima koji su mi pomogli ostvariti ovaj doktorski rad:

Od srca zahvaljujem svojim mentoricama dr.sc. Biserki Cetini-Čižmek i prof. dr. sc. Jeleni Filipović-Grčić na prenesenom stručnom znanju, stalnom poticanju te razumijevanju, strpljivosti s kojom su me usmjeravale i savjetovale tijekom izrade ovog doktorskog rada.

Iskreno zahvaljujem Dragi Špoljariću na uspješnoj stručnoj suradnji i na tome što mi je nanovo otkrio ljepote matematičkih jednadžbi na najjednostavniji mogući način i Maji Radić na nesebičnom dijeljenju znanja o ispitivanjima na Caco-2 stanicama.

Hvala PLIVI Hrvatska d.o.o. koja je omogućila izradu ovog rada i Pavelu Farkašu na ukazanoj prilici i konstantnoj podršci.

Teško je nabrojati sve moje drage prijatelje i kolege iz tvrtke Pliva sa mnom dijelili svoje znanje i iskustvo, pomagali mi i podržavali moj stručni i osobni razvoj.

Želim se zahvaliti mojim Žuvelama na pruženoj ljubavi, pažnji i podršci; premda smo kilometrima dosta udaljeni, u srcima i mislima smo uvijek jako blizu. I mojim Vuletićima koji su mi bili velika podrška tijekom ovom perioda.

Hvala mojim prijateljicama na beskonačnom strpljenju kojeg su mi pružile dok su slušale moje priče o matematičkim modelima i podršci koju su mi pružile kad mi je bila najpotrebnija.

I na kraju, najposebnija zahvala ide mom mužu Marku i sinu Ivanu; vi ste moja svjetlost, najveća radost i snaga. Hvala vam na beskrajnoj ljubavi koju mi pružate. Volim vas!

Sažetak

Vrlo važan korak tijekom razvoja novog lijeka jest kreiranje klinički relevantne *in vitro* metode oslobađanja lijeka. Tijekom razvoja lijeka studije bioraspoloživosti lijeka *in vivo* mogu zamijeniti ispitivanjem oslobađanja lijeka *in vitro* ako je uspostavljen matematički model koji opisuje odnos između profila oslobađanja lijeka *in vitro* i odgovora *in vivo* (koncentracija lijeka u plazmi ili frakcija apsorbiranog lijeka) koji se naziva *in vitro – in vivo* korelacija (IVIVC).

Cilj je ovog rada klasificirati metaksalon prema biofarmaceutskoj klasifikaciji lijekova (BCS), razviti klinički relevantnu *in vitro* metodu oslobađanja lijeka i uspostaviti IVIVC model.

Topljivost lijeka ispitivana je pri različitim pH vrijednostima medija, a permeabilnost je provedena na Caco-2 staničnome modelu. Testovi oslobađanja *in vitro* provedeni su s trima različitim formulacijama tableta s trenutačnim oslobađanjem metaksalona uz primjenu aparature tipa 2. Iste su formulacije tableta i oralna otopina metaksalona korištene u bioekvivalencijskoj studiji *in vivo* na zdravim ispitanicima u randomiziranom, ukriženom pokusu. IVIVC je uspostavljen metodom utemeljenom na diferencijalnim jednadžbama.

Dobiveni su rezultati potvrdili da metaksalon prema klasifikaciji lijekova BSC pripada klasi 2. Provedena bioekvivalencijska studija potvrdila je da je oslobađanje lijeka ključan korak koji utječe na bioraspoloživost i jedna je ispitivana formulacija tableta imala značajno veću bioraspoloživost od referentne formulacije. Najviši stupanj korelacije postignut je primjenom metode s acetatnim puferom pH 4,5 uz dodatak 0,5 % natrijeva klorida i 0,2 % natrijeva laurilsulfata (USP aparatura 2, 50 okr./min) kao medijem za oslobađanje lijeka *in vitro*. Validacijom modela utvrđena je njegova prihvatljiva pogreška, čime je potvrđena točnost predviđanja razvijenoga IVIVC modela.

Ta spoznaja omogućuje optimizaciju formulacija tableta metaksalona i izbjegavanje nepotrebnih ispitivanja neadekvatnih formulacija na zdravim dobrovoljcima. Identificirani *in vitro* medij može poslužiti za razvoj generičkog lijeka drugih molekula sličnih fizikalno-kemijskih svojstava. U ovom je radu IVIVC model uspostavljen izravnom metodom utemeljenom na diferencijalnim jednadžbama, koji se može primijeniti kao alternativni model za uspostavu IVIVC-a lijekova BCS klase 2 s trenutačnim oslobađanjem.

Ključne riječi: metaksalon, topljivost, apsorpcija na Caco-2 staničnome modelu, klinički relevantna *in vitro* metoda oslobađanja lijeka, *in vitro – in vivo* korelacija utemeljena na diferencijalnim jednadžbama

Summary

Introduction. An important step during drug development process is design of a clinically relevant *in vitro* drug e dissolution method which provides a good correlation with the *in vivo* drug release. *In vitro* testing may serve as a surrogate for *in vivo* bioavailability study if *in vitro-in vivo correlation* (IVIVC), a predictive mathematical model describing the relationship between an *in vitro* property of a dosage form and relevant *in vivo* response (plasma drug concentration or fraction of the absorbed drug) is established.

The Biopharmaceutics Classification System (BCS) has become instrumental for the formulation scientist to identify an appropriate strategy to accelerate the drug development process, and BCS also dictates regulatory requirements for the approval of a drug product. Different levels of IVIVC have been explored and reported in literature including guidelines published by various regulatory authorities. Level A correlation is the highest level of correlation achievable as it is a point to point (1:1) relationship between *in vitro* release profile and the *in vivo* profile of a drug. Levels B, C and D are less informative correlations which partially relate *in vitro* and *in vivo* results. Many methods of developing IVIVC models have been established using various mathematical approaches including deconvolution, convolution and differential equations based methods as well as physiologically based pharmacokinetic models (PBPK). An alternative to the most commonly used deconvolution methods are those with built-in convolution step, such as nonlinear mixed effects approach to the IVIVC modeling. The differential equation-based IVIVC method directly relates the *in vivo* plasma drug concentration and the *in vitro* drug dissolution rate. This is a one-stage method and in many ways similar to a convolution-based method. Instead of using integral transformation, the corresponding differential equations that result from the underlying pharmacokinetic model are solved directly.

Development of IVIVCs for sustained/controlled release formulations have been extensively studied, but, the task is challenging for immediate release (IR) dosage forms because these products are designed to release the drug immediately to allow rapid drug absorption.

The subject of the studies reported here is metaxalone that is indicated for the relief of discomfort associated with acute, painful musculoskeletal conditions. The aim of PhD thesis was to classify metaxalone according to the BCS and to characterize the mechanisms of metaxalone transport across the intestinal barrier using a Caco-2 cell monolayer model, to investigate the effect of hydroxypropylmethyl cellulose 6cp (HPMC) and povidone K30

(PVP) on solubity, permeability, *in vitro* release *and in vivo* bioavailability of metaxalone, to develop a clinically relevant dissolution method that can be used to predict the oral absorption of metaxalone, to establish level A *in vitro-in vivo* correlation (IVIVC) and to confirm the reliability of the model.

Methods. The equilibrium solubility of the drug was determined in a series of pH/buffer media covering the entire physiological pH range (1.2 to 7.4) of the gastrointestinal (GI) tract and permeability studies were performed using a Caco-2 cell model with an aim to characterize the mechanisms of metaxalone transport.
In vitro dissolution data were obtained using a USP 2 apparatus (at 50 rpm) attached to a UltraViolet-Visible (UV-Vis) spectrophotometer. For the development of a clinically relevant dissolution method, dissolution testing of all three formulations (i.e., Test A, Test B, and Skelaxin®) was performed in pH 4.5 USP acetate buffer and pH 6.8 USP phosphate buffer with the addition of 0.5% NaCl and a gradually increasing concentration of sodium lauryl sulfate (by 0.1% SLS) from 0.1% to 0.4%. *In vitro* testing was also performed according to the USP method for metaxalone tablets using a USP 2 apparatus at 100 rpm with 900 mL of water containing 0.5% SLS.

A randomized 4-way crossover study was conducted in 18 healthy male volunteers under fasting conditions as per Good Clinical Practice. During each period, subjects received one of the four treatments administered orally as an 800 mg tablet (i.e., Test A, Test B, and Skelaxin®) or a 400 mg dose of an oral solution under standardized conditions, according to a randomization schedule. Additionally, each treatment was separated by a one-week wash-out period. Blood samples were drawn at predetermined timepoints and metaxalone analysis in plasma was performed using a validated liquid chromatography method that employed mass spectrometry detection.

Data were analyzed by a one-compartment open model with the first-order absorption using the Wolfram Mathematica 11.1 software package and a non-compartmental analysis using the WinNonlin version 6.4 software package was employed as well. A statistical analysis of pharmacokinetics parameters was carried out using an analysis of variance (ANOVA) on the ln-transformed maximum concentration (C_{max}) and area under the curve from time zero to time of lastnon-zero concentration (AUC_t) values and the ratios of the least-squares means and the 90% geometric confidence intervals were calculated for the ln-transformed C_{max} and AUC_t using the WinNonlin version 6.4 software package.

A direct, differential-equation-based IVIVC method was used to establish the level A IVIVC. The solution of differential equation and the pharmacokinetics parameters (C_{max} and AUC_t) was obtained using the Wolfram Mathematica 11.1 software package. To assess the reliability of the models, the prediction errors (PE) were calculated for all three formulations for the observed C_{max} and AUC_t values and compared with predicted values for the same pharmacokinetic parameters.

Results. Solubility profiles of the drug studied in media representing the entire physiological pH range of the gastrointestinal (GI) tract demonstrated pH non-dependent character with solubility of the drug 0.39 mg/ml (mean value). It is also apparent that 800 mg (total) of metaxalone did not dissolve in 250 mL of the aqueous media at any pH within the tested range. Accordingly, the solubility data demonstrate that metaxalone is a drug with low solubility. The inclusion of HPMC and PVP in the tablet formulation has no influence on the metaxalone solubility. The results obtained from the permeability studies using Caco-2 cells demonstrated high permeability of the drug. The permeability studies also suggested passive transport of metaxalone and indicated that metaxalone is not a substrate for Pgp efflux pump. Metaxalone has been confirmed as a Class 2 drug according to BCS.

The *in vitro* dissolution results demonstrate pH-dependent release profile of the drug as the release rate was significantly different in dissolution media with different pH. As expected, increasing the SLS concentration also increased the metaxalone dissolution rate. Although the solubility of metaxalone is pH-independent the dissolution rate of the drug from the tablets was pH-dependent. This is not surprising as different binders were used in the studied formulations to test their impact on manipulation of the drug release. The dissolution profiles obtained using the USP method (900 mL water with 0.5% SLS) demonstrate that the USP method is unable to predict bioavailability of the tested formulations.

Bioavailability studies performed in humans revealed that the Test A formulation had a significantly higher rate and extent of absorption in comparison to Skelaxin®, as evidenced by a Test A/Skelaxin® ratio of approximately 129.52% and 174.24% for AUC and C_{max}, respectively. The Test B formulation showed a lower rate and extent of absorption when compared to Skelaxin®, with Test B/Skelaxin® ratios of approximately 56.99% and 35.07% for AUC and C_{max}, respectively. Neither of the test products were bioequivalent to Skelaxin®. It was shown that the Test A product had better bioavailability than the marketed product Skelaxin®, indicating the possibility of developing metaxalone formulations with higher bioavailability to allow a dose reduction and/or drug efficacy improvement. The oral solution

had a substantially higher rate and extent of absorption when compared to all three tablet formulations, implying low bioavailability due to the dissolution limitations of the tablet formulation.

A one-step IVIVC approach that links the plasma concentration to *in vitro* data and employs an underlying pharmacokinetic model was used to develop a level A IVIVC model for metaxalone. A one compartment model with first-order absorption was also applied to model the *in vivo* profiles of the tablet formulations and oral solution. The mean concentration profiles obtained by this modeling approach are more meaningful profiles than those obtained just by averaging at every sampling point. Notably, the pharmacokinetic parameters (C_{max} and AUC_t) have very similar values as determined by noncompartmental analysis. Based on the rank order comparability, the *in vitro* results obtained in pH 4.5 media with 0.5% NaCl and gradually increasing concentrations of SLS from 0.1 to 0.4% and pH 6.8 media with 0.5% NaCl and 0.1 and 0.2% SLS were used for the further investigation of the IVIVC. The other *in vitro* test results obtained with medium pH 6.8 and the USP method were excluded because they did not produce rank order profiles similar to the *in vivo* profiles obtained from the human studies. In the next IVIVC development step, the results from *in vitro* media pH 6.8 with 0.1% and 0.2% SLS were discarded because the difference between formulations B and Skelaxin® was less than 6%. The IVIVC developed using the dissolution media at pH 4.5 with the addition of 0.1, 0.3 and 0.4% SLS produced higher percent prediction errors than allowed by the regulatory agencies, indicating that these media are not suitable for the dissolution testing of metaxalone when attempting to establish an IVIVC. A simple variant of an exponential model produced a reasonably good fit for the *in vitro* release data from all the tablets tested in pH 4.5 dissolution medium containing 0.5% NaCl and 0.2% SLS. The other parameters in the prediction model for the *in vivo* concentrations were determined by fitting the model with the *in vitro* parameters obtained from pH 4.5+ 0.5% NaCl + 0.2% SLS medium to obtain the mean *in vivo* data. The common scaling factors applied to *in vitro* dissolution profiles of all three formulations were included in the model to establish a meaningful IVIVC. A highest level of correlation with *in vivo* data was established with the *in vitro* data obtained in pH 4.5 dissolution medium containing 0.5% NaCl with 0.2% SLS (USP apparatus 2 at 50 rpm). An IVIVC model validation was performed and demonstrated an acceptable internal predictability. The excellent agreement of the elimination rate constant obtained by fitting the model with the elimination constant obtained from the immediate

release oral solution data from the bioequivalence study demonstrates the reliability and clinical relevance of the recommended IVIVC model.

Conclusion. The solubility and permeability results clearly revealed that metaxalone is a BCS class 2 drug. The results of this study show that metaxalone is subject to passive transcellular transport and that it is not a substrate for the P-gp efflux pump. Human studies demonstrated that dissolution appears to be the rate limiting factor for the absorption of metaxalone and the Test A product had improved metaxalone bioavailability in comparison to the marketed product Skelaxin®.

We have established a Level A IVIVC using a direct, differential equation (DDE) based methodology for metaxalone immediate release tablets (Test A and Test B) and recommended a clinically relevant dissolution method (Apparatus 2, 50 rpm, pH 4.5 + 0.5% NaCl with 0.2% SLS) that can be used to provide good predictability of *in vivo* drug performance.

Based on these findings, it is possible to further optimize the development of metaxalone tablets and to avoid unnecessary testing of inadequate formulations on healthy volunteers. The identified *in vitro* medium can serve in the generic development of other molecules of similar physical-chemical characteristics. Moreover, the use of a direct differential equation to establish IVIVC has rarely been explored in the past and hence this approach can be used as an alternative IVIVC model for BCS class 2 drugs with immediate release.

Keywords: metaxalone, solubility, Caco-2 cell absorption, clinically relevant dissolution method, direct differential equation based *in vitro-in vivo* correlation

1. UVOD **1**
2. TEORIJSKI DIO **4**
2.1. Biofarmaceutska klasifikacija lijekova **5**
2.1.1. Topljivost 7
2.1.2. Permeabilnost 7
2.1.3. *In vitro* oslobađanje lijekova 9
2.1.3.1. Teorija *in vitro* otapanja 10
2.1.3.2. Aparature za ispitivanje *in vitro* oslobađanja 13
2.1.3.3. Odabir *in vitro* medija 14
2.1.3.4. Modeliranje i usporedba profila *in vitro* oslobađanja 17
2.1.3.4.1. Model-neovisne metode 17
2.1.3.4.2. Model-ovisne metode 18
2.2. Oralna primjena lijekova **19**
2.3. Apsorpcija lijeka nakon oralne primjene **21**
2.3.1. Mehanizmi apsorpcije lijekova 22
2.3.2. Anatomija i fiziologija probavnog sustava 23
2.3.2.1. Svojstva gastrointestinalnih tekućina 25
2.3.2.2. Predsistemski metabolizam lijekova 27
2.3.3. Fizikalno-kemijski činitelji koji utječu na apsorpciju lijekova 27
2.3.3.1. Topljivost 28
2.3.3.2. Permeabilnost 28
2.3.4. Biofarmaceutski činitelji koji utječu na apsorpciju lijekova 29
2.3.5. Osnove farmakokinetike i farmakokinetički modeli 30
2.3.5.1. Jednoprostorni model 30
2.4. *In vitro – in vivo* korelacija **32**
2.4.1. Kategorije IVIVC-a 33
2.4.2. Razvoj kategorije A IVIVC modela 33
2.4.2.1. Model-ovisne metode 34
2.4.2.2. Model-neovisne metode 34
2.4.3. Interna i eksterna predikcija kategorije A IVIVC modela 39
2.4.4. Primjena IVIVC modela 40
2.5. Opća svojstva metaksalona **40**
2.5.1. Farmakokinetička svojstva metaksalona 41

2.5.2. Fizikalno-kemijska i biofarmaceutska svojstva metaksalona 42
3. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA 44
4. MATERIJALI I METODE 46
4. 1. Materijali 47
4.1.1. Uzorci formulacija 47
4.1.2. Mediji za ispitivanje topljivosti, permeabilnosti i *in vitro* oslobađanja 49
4.2. Metode 52
4.2.1. Ispitivanje topljivosti 52
4.2.2. Ispitivanje *in vitro* oslobađanja metaksalona iz tableta 53
4.2.3. Određivanje permeabilnosti primjenom modela stanica Caco-2 53
4.2.4. *In vivo* ispitivanje 58
4.2.5. Uspostava *in vitro – in vivo* korelacije 63
4.2.5.1. Izračun profila *in vivo* apsorpcije dekonvolucijskom metodom 63
4.2.5.2. Izračun profila *in vivo* apsorpcije Wagner-Nelsonovom metodom 64
4.2.5.3. Određivanje kategorije A IVIVC modela 64
5. REZULTATI I RASPRAVA 66
5.1. Topljivost metaksalona 67
5.2. Rezultati permeabilnosti na stanicama Caco-2 69
5.2.1. Permeabilnost standarda 70
5.2.2. Permeabilnost metaksalona 71
5.3. *In vitro o*slobađanje metaksalona 73
5.4. *In vivo* rezultati 78
5.4.1. Krivulje *in vivo* oslobađanja 85
5.4.1.1. Metoda dekonvolucije 85
5.4.1.2. Wagner-Nelsonova metoda 87
5.5. Uspostava i validacija IVIVC modela 88
6. ZAKLJUČAK 98
7. LITERATURA 102
8. ŽIVOTOPIS……..…112

1. UVOD

Nakon peroralne primjene lijekovi u organizmu nailaze na mnoge fizičke, kemijske i biološke prepreke/promjene koje određuju njihovu sudbinu u organizmu, odnosno njihovu farmakokinetiku. Farmakokinetika lijeka obuhvaća procese oslobađanja lijeka iz njegova farmaceutskog oblika, njegovu apsorpciju, raspodjelu u organizmu, metabolizam i uklanjanje iz organizma. Samo oslobođene i otopljene molekule lijeka mogu se apsorbirati, raspodijeliti u organizmu i, vezanjem na receptore, ostvariti djelovanje. Djelovanje lijeka ovisi o njegovoj koncentraciji na mjestu djelovanja i jačini vezanja lijeka s receptorom. Koncentracija sistemski primijenjenog lijeka na mjestu djelovanja u ravnoteži je s koncentracijom lijeka u krvi – to je osnovno farmakokinetičko načelo. Koncentracija lijeka u krvi/sistemskoj cirkulaciji ovisi o bioraspoloživosti lijeka. Bioraspoloživost je farmakokinetički parametar koji govori o brzini i opsegu apsorpcije primijenjene doze lijeka u sistemsku cirkulaciju. Bioraspoloživost peroralno primijenjenog lijeka ovisi o njegovim fizikalno-kemijskim svojstvima i farmaceutskom obliku. Dakle, na bioraspoloživost lijeka može se utjecati kreiranjem farmaceutskog oblika lijeka prikladnih/potrebnih fizikalno-kemijskih svojstava. Jedno od najvažnijih svojstava farmaceutskog oblika lijeka jest brzina i opseg oslobađanja molekula lijeka. Oslobađanje lijeka iz farmaceutskog oblika proces je koji obuhvaća otapanje i difuziju lijeka. Oslobađanje lijeka iz čvrstih formulacija, primjerice tableta, podrazumijeva i raspadanje tableta na sitnije dijelove odnosno do finih čestica. Brzinu oslobađanja određuje/ograničava najsporiji proces u nizu. Brzina i opseg oslobađanja lijeka, uz fizikalno-kemijska svojstva samog lijeka, određuju/ograničavaju njegovu apsorpciju. Stoga se pri razvoju lijeka prikladnim metodama *in vitro* određuju i prate njegova fizikalno-kemijska svojstva i oslobađanje iz farmaceutskog oblika. S obzirom na dva najvažnija fizikalno-kemijska svojstva lijeka, topljivost i permeabilnost, koja utječu na apsorpciju peroralno primijenjenih lijekova, uvedena je tzv. biofarmaceutska klasifikacija lijekova (BCS). BCS klasa nekog lijeka govori o tome jesu li topljivost i/ili permeabilnost limitirajući činitelji za njegovu apsorpciju odnosno bioraspoloživost te koji su prikladni načini oblikovanja tog lijeka. Katkad je regulatorno prihvatljivo provesti propisana *in vitro* ispitivanja umjesto ispitivanja apsorpcije/bioraspoloživosti lijeka *in vivo* [1]. Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) i Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) uvele su smjernice o *in vitro – in vivo* korelaciji (IVIVC). Prema tim smjernicama, *in vitro* ispitivanje oslobađanja lijeka može se koristiti kao zamjena za bioekvivalencijsko ispitivanje *in vivo* samo ako je uspostavljena najveća kategorija povezanosti (kategorija A) između *in vitro* i *in vivo* rezultata [2, 3]. Obje su regulatorne agencije također uvele smjernice za upotrebu *in vitro* ispitivanja kao zamjene za

bioekvivalencijsko ispitivanje ako lijek prema biofarmaceutskoj klasifikaciji pripada klasi 1. ili klasi 3. i ispunjava sve propisane zahtjeve [4, 5].

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Biofarmaceutska klasifikacija lijekova

Amidon i suradnici predložili su 1995. biofarmaceutsku klasifikaciju lijekova (Biopharmaceutics Classification System, BCS) kojom se lijekovi za peroralnu primjenu dijele u četiri kategorije ovisno o njihovoj topljivosti i permeabilnosti [1].

Također su definirali tri broja koja karakteriziraju djelatnu tvar: dozni broj (D_0), broj brzine oslobađanja (D_n) i apsorpcijski broj (A_n). Ti brojevi označavaju temeljne procese permeabilnosti membrane, oslobađanja lijeka i primjenjene doze [1].

S obzirom na to da količina djelatne tvari koja se otopi *in vivo* ovisi o dozi i volumenu tekućine s kojom se uzima lijek, uveden je dozni broj D_0, koji se određuje iz jednadžbe:

$$D_0 = \frac{M_0}{V_0 \times C_s} \tag{1}$$

u kojoj je M_0 doza lijeka, V_0 volumen tekućine s kojom se uzima lijek (250 ml), a C_s je topljivost lijeka. Topljivost djelatne tvari također se može odrediti uz pomoć omjera doze i topljivosti koji označava volumen potreban da se primijenjena doza otopi [6].

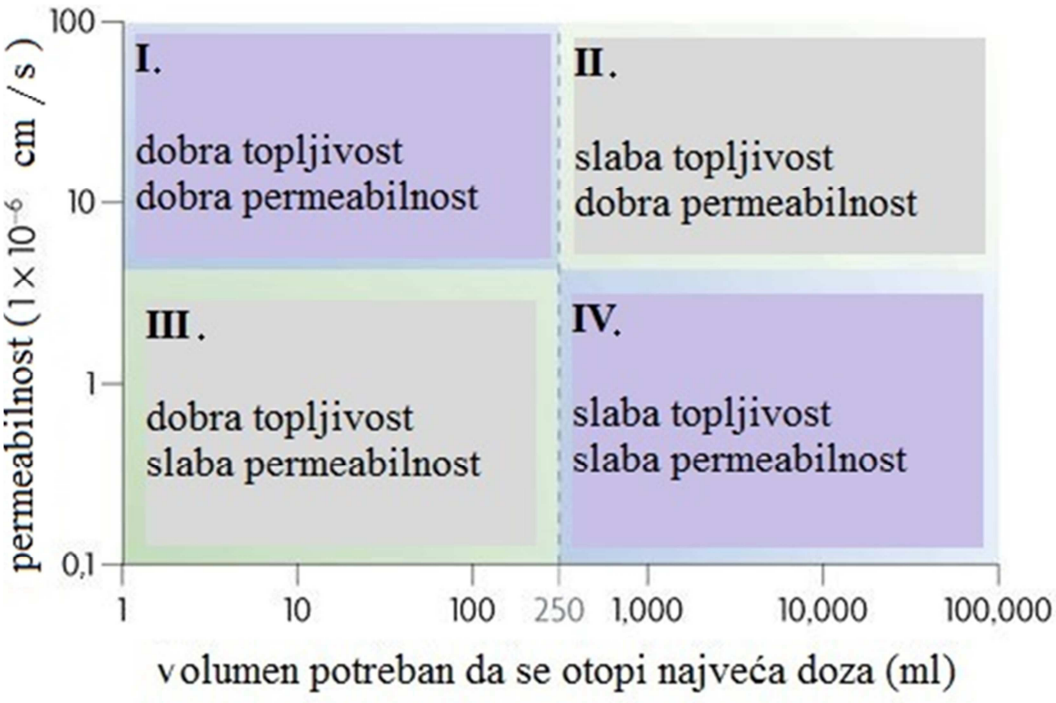
Apsorpcijski broj ovisi o permeabilnosti (P_{eff}), radijusu lumena crijeva (R) i srednjem vremenu zadržavanja u crijevu (t_{res}):

$$A_n = \frac{t_{res}}{t_{aps}} = \frac{P_{eff}}{R} \times t_{res} \tag{2}$$

Broj brzine oslobađanja omjer je srednjeg vremena zadržavanja lijeka u gastrointestinalnom traktu (t_{res}) i vremena potrebnoga da se on otopi (t_{diss}), a ovisi o topljivosti (C_s), difuzivnosti (D), gustoći (ρ) i inicijalnoj veličini čestica (r_0), kako pokazuje jednadžba:

$$D_n = \frac{t_{res}}{t_{diss}} = \frac{3 \times D \times C_s}{{r_0}^2 \times \rho} \times t_{res} \tag{3}$$

Prema parametrima koji definiraju D_0, D_n i A_n, očito je da su topljivost i permeabilnost ključni parametri koji kontroliraju apsorpciju lijekova i prema njima se svi lijekovi mogu kategorizirati u četiri skupine prikazane na **slici 1** [1].



Slika 1. BCS klasifikacija lijekova [preuzeto i prilagođeno prema 7 uz dozvolu Springer Nature]

Tsume i suradnici predložili su jednostavno proširenje BCS klasifikacije u tri potkategorije ovisno o svojstvima molekule (a – kisela, b – bazična i c – neutralna) s obzirom na to da kisela odnosno bazična svojstva imaju znatan utjecaj na *in vitro* i *in vivo* oslobađanje. Predložene BCS potkategorije mogu poslužiti za razvoj *in vitro* metoda i predviđanje apsorpcije [8].

Bennet i suradnici predložili su proširenje biofarmaceutske klasifikacije lijekova kojom se uzima u obzir dispozicija lijekova – BDDCS (engl. *biopharmaceutics drug distribution classification system*)[9]. Ta je klasifikacija alat kojim se mogu predviđati dispozicija lijekova i interakcije među lijekovima već u ranim fazama razvoja lijeka, kao i predikcija važnosti transportera [9].

Butler i Dressman predložili su daljnju modifikaciju BCS klasifikacije koja se naziva DCS klasifikacijom (engl. *developability classification system*). Revidirana klasifikacija uzima u obzir topljivost u crijevima, kompenzacijski odnos topljivosti i permeabilnosti u tankome crijevu i pomaže pri određivanju ciljane veličine čestica koja je potrebna da se izbjegne smanjena apsorpcija zbog ograničenog oslobađanja lijeka. Rezultati dobiveni ispitivanjem

više molekula, pokazuju da je predložena klasifikacija u predviđanju kritičnih faktora koji utječu na *in vivo* apsorpciju bolja od originalne BCS klasifikacije [10].

2.1.1. Topljivost

Djelatna se tvar može smatrati dobro topljivom ako je dozni broj D_0 manji ili jednak 1 [11]. Prema regulatornim smjernicama (FDA, EMA), provodi se ispitivanje topljivosti u vodenim puferima pH vrijednosti u području 1,0 – 6,8 pri temperaturi od 37 ± 1 °C [4, 5]. Prema EMA-inoj smjernici, ispitivanje topljivosti treba provesti u najmanje tri pufera (preporuka je da njihov pH bude 1,2; 4,5 i 6,8) te se preporučuje ispitivanje u puferu pH koji je jednak pKa vrijednosti lijeka [5]. Prema smjernici FDA-e, ispitivanje topljivosti provodi se pri pH = 1, pH = pKa, pH = pKa + 1, pH = pKa - 1 i pH = 6,8 [4]. Vrijednost pH otopine treba provjeriti prije i nakon dodavanja ispitivane djelatne tvari u pufer. Djelatna tvar se smatra dobro topljivom ako se najviša pojedinačno primijenjena doza formulacije lijeka s trenutačnim oslobađanjem otopi u 250 ml ili manje pufera. Vrijednost od 250 ml izabrana je jer je to uobičajena količina vode s kojom se uzima lijek tijekom bioekvivalencijskog ispitivanja.

2.1.2. Permeabilnost

Permeabilnost lijeka, odnosno njegovo svojstvo prolaženja kroz stijenke probavnog trakta, može se odrediti *in vivo* studijama apsolutne bioraspoloživosti ili studijama s radioaktivnim izotopom (engl. *mass balance study*) na ljudima.

Smatra se da lijek zadovoljava kriterij visoke permeabilnosti ako je apsolutna bioraspoloživost veća ili jednaka 85 % ili ako rezultati studije s radioaktivnim izotopom pokazuju da je količina nepromijenjenog lijeka izlučenoga u urinu te metabolita koji su rezultat I. i II. faze metabolizma izlučenih putem urina i fecesa veća ili jednaka 85 % primijenjene doze lijeka [5].

Osim studija na ljudima, permeabilnost lijekova može se određivati ovim metodama:

- *in vivo* ili *in situ* intestinalnom perfuzijom na odgovarajućemu životinjskomu modelu

- *in vitro* studijom permeabilnosti na *ex-vivo* ljudskim ili životinjskim intestinalnim tkivima
- *in vitro* studijom permeabilnosti na kultiviranim epitelnim stanicama (Caco-2, Madin-Darby canine kidney-MDCK stanice, TC-7, HT29-MXT, 2/4/A1). [4]

Caco-2 model najprimjenjivaniji su i najdetaljnije karakteriziran stanični model za ispitivanje permeabilnosti jer vrlo dobro koreliraju s humanim podatcima. Ta se stanična linija dobiva iz stanica humanog adenokarcinoma koje prolaze spontanu diferencijaciju u stanice koje strukturno i funkcionalno nalikuju na enterocite te imaju uske pore među stanicama i mnoge funkcije normalnih enterocita. Sadržavaju neke CYP izoenzime (bez CYP 3A4) i enzime II. faze kao što je glutation S-transferaza i sulfotransferaza. Također su prisutni različiti transporteri kao što su peptidni transporteri, organski kationski/anionski transporteri, transporteri žučnih soli te P-gp, MRP2, BCRP itd. [12]. Stanice Caco-2 rastu i diferenciraju se u periodu od 18 do 28 dana kao monosloj na polupropusnoj membrani koja se stavlja u komoru tako da polupropusna membrana razdvaja gornji od donjeg odjeljka. Gornji se odjeljak naziva apikalnim i predstavlja luminalnu stranu crijeva, dok se donji odjeljak naziva bazolateralnim i predstavlja portalni krvotok / limfni tok u gastrointestinalnom traktu [13]. Pritom se određuje transport kroz stanični monosloj u apikalno-bazolateralnom smjeru (AB) ili bazolateralno-apikalnom smjeru (BA).

Koeficijent permeabilnosti izračunava se prema formuli [14]:

$$P_{app} = (dQ/dt)/(A \times C_0) \quad (4)$$

u kojoj je dQ/dt koeficijent nagiba kumulativne koncentracije lijeka u vremenu u odjeljku akceptora na bazolateralnoj strani, A površina membrane i C_0 inicijalna koncentracija u donorskom odjeljku na apikalnoj strani ako je riječ o ispitivanju transporta u AB smjeru. Pri transportu u BA smjeru odjeljak akceptora je na apikalnoj strani, a donorski odjeljak na bazolateralnoj strani.

Vrijednost P_{app} nije konstantna i ovisi o uvjetima provođenja pokusa te o karakteristikama sloja Caco-2 stanica; stoga se u svakom pokusu rabe i referentne tvari koje predstavljaju visokopermeabilni standard (npr. propanolol) i niskopermeabilni standard (npr. manitol) [13]. Djelatne tvari koje se dobro apsorbiraju imaju visok koeficijent permeabilnosti ($P_{app} > 1\times10^{-6}$ cm/s), a djelatne tvari koji se slabije apsorbiraju imaju nizak koeficijent

permeabilnosti ($P_{app} < 1\times10^{-7}$ cm/s) [15]. Ako se eksperimentalno dobivene P_{app} vrijednosti AB smjera razlikuju od P_{app} vrijednosti BA smjera ili ako se P_{app} vrijednosti smanjuju s povećanjem koncentracije djelatne tvari, može se zaključiti da se ispitivana djelatna tvar aktivno apsorbira te da su u proces apsorpcije uključeni transporteri. Ako je riječ o aktivnom transportu, bitno je odrediti afinitet djelatne tvari prema P-glikoproteinu (P-gp). [13].

Nedostatci staničnog modela Caco-2 jesu: nedostatak ekspresije CYP 3A4 izoenzima, smanjena ili drukčija ekspresija nekih transportnih proteina, nemogućnost kvantitativnog razlikovanja lijekova koji imaju osrednju permeabilnost, nedostatak sluzi te slaba topljivost ispitivane djelatne tvari u vodenim puferima [12, 16]. Topljivost djelatne tvari može se povećati dodatkom organskih otapala, ali finalna koncentracija organskog otapala u otopini koja se nanosi na stanice ne smije prelaziti 1 % jer veće koncentracije otapala mogu ugroziti stanični integritet [12]. Još jedan nedostatak stanica Caco-2 jest nepostojanje korelacije s *in vivo* apsorpcijom hidrofilnih djelatnih tvari koje se apsorbiraju paracelularnim putem jer su paracelularne pore tog *in vitro* staničnog modela uže nego u ljudi [12, 14, 15, 16]. Premda postoje nedostatci Caco-2 modela, model se može primjenjivati za predviđanje apsorpcije lijeka u gastrointestinalnom traktu. Najbolja korelacija s *in vivo* rezultatima postiže se za djelatne tvari koje se apsorbiraju pasivnim, transcelularnim putem [15, 17].

2.1.3. *In vitro* oslobađanje lijekova

Ispitivanje *in vitro* oslobađanja lijekova ima vrlo važnu ulogu tijekom razvoja proizvoda i kontrole kvalitete lijeka. U ranim fazama razvoja lijekova (predformulacije) na temelju *in vitro* oslobađanja karakterizira se sama djelatna tvar i odabire optimalan oblik formulacije za daljnji razvoj lijeka. U kasnijim fazama *in vitro* oslobađanje služi za usporedbu različitih formulacija, za razjašnjavanje procesa oslobađanja lijeka, kao indikator stabilnosti formulacije, za potvrdu robusnosti i reproducibilnosti proizvodnog procesa te za potvrdu kvalitete lijeka koji izlazi na tržište [18].

Premda je tradicionalno glavni cilj ispitivanja *in vitro* oslobađanja lijekova bio osiguranje reproducibilnosti proizvodnje određenog proizvoda, u posljednje se vrijeme prema konceptu kvalitete ugrađene u dizajn (engl. *quality by design*, QbD) sve više naglašava potreba

uspostavljanja poveznice između svojstava lijeka, njegova *in vitro* oslobađanja i ponašanja u organizmu [19].

Uvođenjem regulatornih smjernica vezanih za BCS klasifikaciju lijekova i *in vitro – in vivo* korelacije, *in vitro* oslobađanje može služiti kao pouzdan pokazatelj *in vivo* ponašanja lijeka. U tim slučajevima *in vitro* oslobađanje može zamijeniti bioekvivalencijska ispitivanja [2, 3, 4, 5, 20].

2.1.3.1. Teorija *in vitro* otapanja

Proces otapanja čvrste čestice lijeka u vodenome tjelesnom mediju može se podijeliti na pet koraka koji su prikazani na **slici 2**.

To su:

a) močenje površine čestice lijeka vodom

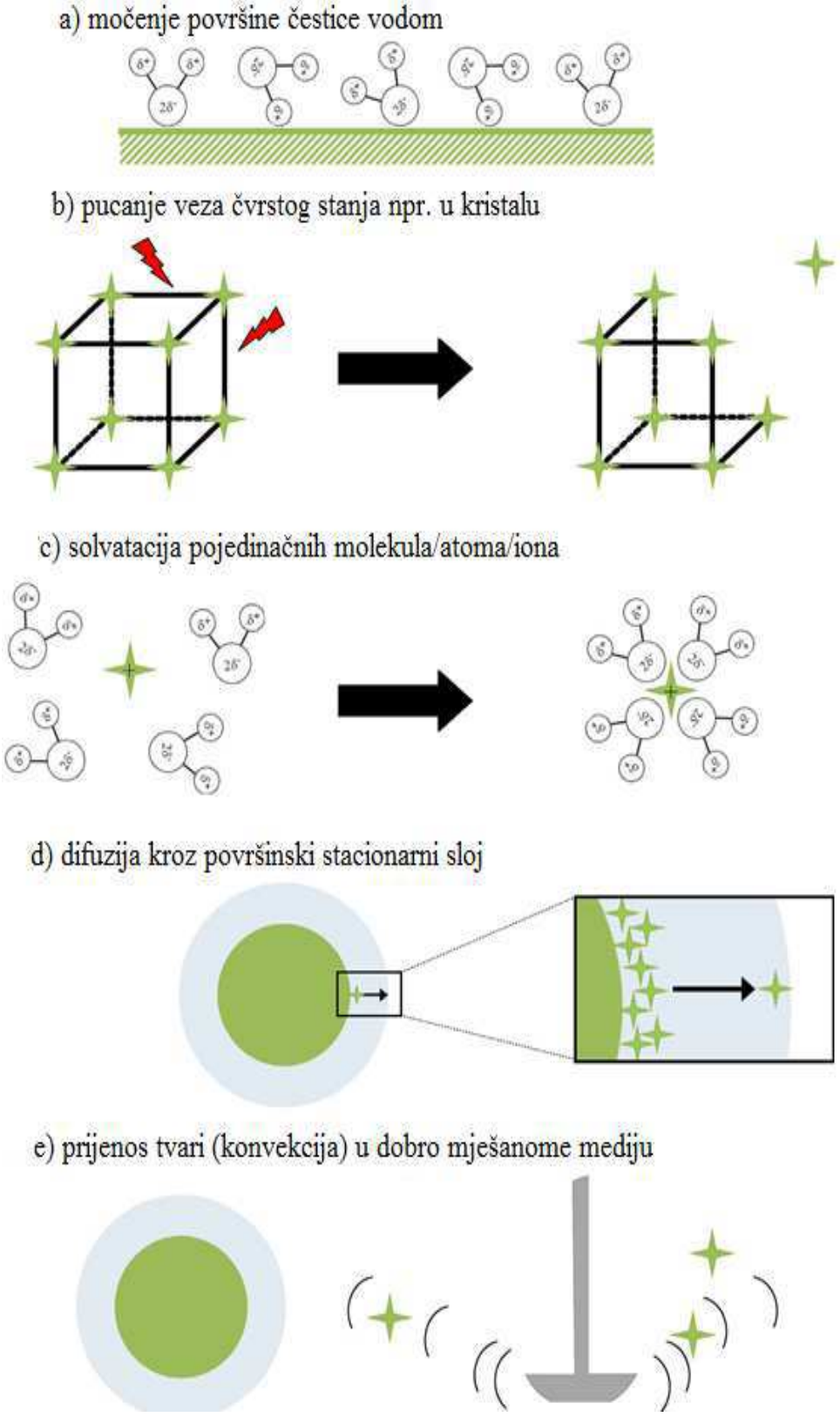
b) pucanje veza čvrstog stanja u čestici lijeka

c) okruživanje pojedinačnih molekula/iona/atoma lijeka slojem molekula vode

d) difundiranje takvih čestica kroz površinski stacionarni sloj medija

e) prijenos molekula/iona/atoma lijeka konvekcijom u tekućinu koja se dobro miješa [21].

Pojmovi otapanje lijeka (engl. *drug dissolution*) i oslobađanje lijeka (engl. *drug release*) nisu nužno sinonimi iako se u literaturi često nedovoljno razlikuju. Otapanje lijeka obuhvaća pet prethodno opisanih koraka (**slika 2**), dok je oslobađanje lijeka znatno složeniji pojam koji obuhvaća oslobađanje lijeka iz formulacijskog matriksa i otapanje djelatne tvari u vodenome mediju. Samo ako je otapanje lijeka ograničavajući korak (engl. *rate limiting step*) u cijelom procesu oslobađanja, ta se dva pojma mogu upotrebljavati kao sinonimi [21, 22].



Slika 2. Shematski prikaz pet osnovnih koraka uključenih u proces otapanja čvrste čestice lijeka u dobro miješanome vodenome mediju [preuzeto i prilagođeno prema 22 uz dozvolu Elsevier]

Otapanje lijeka matematički se može opisati uz pomoć modificirane Noyes-Whitneyeve jednadžbe:

$$DR = \frac{dX}{dt} = \frac{A \times D}{h} \times (C_s - \frac{Xd}{V}) \quad (5)$$

gdje $DR -$ brzina otapanja ovisi o: A – dostupnoj površini lijeka, D – difuzijskom koeficijentu lijeka, h – debljini stacionarnog difuzijskog sloja, C_s – topljivosti lijeka u gastrointestinalnim uvjetima, V – volumenu medija dostupnoga da otopi lijek i Xd – količini lijeka koji je već otopljen [23]. Fizikalno-kemijska svojstva djelatne tvari i fiziološki uvjeti u gastrointestinalnom traktu, koji variraju ovisno o tome ima li u njemu hrane ili ne, mogu utjecati na brzinu otapanja lijeka (**tablica 1**).

Tablica 1. Fizikalno-kemijski i fiziološki činitelji koji utječu na otapanje lijeka u gastrointestinalnom (GI) traktu [preuzeto i prilagođeno prema 23 uz dozvolu Elsevier]

Parametar	**Fizikalno-kemijski činitelji**	**Fiziološki činitelji**
A - površina lijeka dostupna za otapanje	veličina čestica	postojanje surfaktanta u GI traktu
D - difuzijski koeficijent	molekularna masa	viskoznost crijevnog sadržaja
h - debljina stacionarnog difuzijskog sloja		motilitet, brzina sekrecije
C_s - topljivost lijeka	hidrofilnost, kristalna struktura	pH, puferski kapacitet, žuč i komponente hrane
Xd - količina otopljenog lijeka		permeabilnost
***V* - dostupni volumen**		sekrecija, volumen tekućine uzet zajedno s lijekom

Da bi se povećala brzina otapanja djelatne tvari (npr. ako je djelatna tvar slabo topljiva), primjenjuju se različite formulacijske strategije. To su:

1. povećanje površine dostupne za otapanje, primjerice smanjenjem veličine čestica
2. povećanje prividne topljivosti djelatne tvari, npr. dodatkom surfaktanta ili ciklodekstrina odnosno uklapanjem u polimerne micele ili liposome [22].

2.1.3.2. Aparature za ispitivanje *in vitro* oslobađanja

Izbor aparatura za *in vitro* oslobađanje lijekova ovisi o svojstvima farmaceutskog oblika i načinu primjene lijeka. Prema američkoj farmakopeji, definirane su četiri aparature u općem poglavlju <711> i tri aparature u općem poglavlju <724> [24]. To je poglavlje nedavno usklađeno s europskom i japanskom farmakopejom radi ujednačivanja definicija i operativnih parametara koji se upotrebljavaju za praćenje oslobađanja lijekova. Aparature su navedene u **tablici 2.**

Tablica 2. Aparature za ispitivanje *in vitro* oslobađanja lijekova [25]

Tip aparature	**Opis**	**Dozirni oblik**
1.	rotirajuća košarica (engl. *rotating basket*)	tablete, kapsule, plutajući ljekoviti oblik
2.	rotirajuća lopatica (engl. *rotating paddle*)	tablete, kapsule, suspenzije
3.	uranjajući cilindar (engl. *reciprocating cylinder*)	oblici s kontroliranim oslobađanjem
4.	protočna ćelija (engl. *flow-trough cell*)	implantanti, suspenzije, slabo topljive djelatne tvari
5.	lopatica iznad diska (engl. *paddle over disk*)	transdermalni sustavi
6.	cilindar (engl. *cylinder*)	transdermalni sustavi
7.	uranjajući držač (engl. *reciprocating holder*)	transdermalni sustavi, oblici s kontroliranim oslobađanjem

Za čvrste oralne farmaceutske oblike najčešće se upotrebljavaju aparature s rotirajućim košaricama (tip 1.) i rotirajućim lopaticama (tip 2.) koje imaju cilindrične posude s hemisferičnim dnom u čijoj je sredini osovina na koju se montiraju lopatice ili košarice. U oba slučaja ispituje se 500 – 1000 ml medija, a najčešće je to 900 ml. Brzina rotacije miješala definira se tijekom razvoja metode. Pri malim brzinama miješanja na dnu posude može se

stvoriti naslaga koja „zarobi“ djelatnu tvar i sprječava daljnje otapanje [26]. Rezultati dobiveni upotrebom obiju aparatura osjetljivi su na različite komponente kao što su dubina, centriranje osovine, niveliranje kupelji, vibracija i nesavršenosti posuda [27].

2.1.3.3. Odabir *in vitro* medija

Cilj ispitivanja oslobađanja lijekova *in vitro* jest razvoj diskriminatorne metode kojom se dobro predviđa *in vivo* oslobađanje lijeka i osjetljiva je na varijable koje mogu utjecati na brzinu oslobađanja lijeka. Potrebno je identificirati odgovarajuću metodu koja je dovoljno diskriminatorna, ali koja neće uzrokovati nepotrebna odbacivanja lijekova koji bi imali dobar *in vivo* profil nakon oralne primjene.

S obzirom na to da se međusobno izmjenjuje nekoliko različitih pojmova, predložena je ova podjela metoda ispitivanja oslobađanja lijekova *in vitro* [28]:

1. QC (engl. *quality control*) *in vitro* metoda
2. biorelevantna metoda
3. klinički relevantna metoda.

QC *in vitro* metoda (engl. *quality control)*

Zadaća QC metode jest otkrivanje promjena tijekom rutinskoga proizvodnog procesa ili tijekom čuvanja lijeka koje mogu negativno utjecati na kvalitetu proizvoda, a primjenjuje se u posljednjim fazama razvoja lijeka ili nakon njegova službenog odobrenja. Ovisno u proizvodu, te promjene mogu biti povezane s djelatnom tvari, sirovinama ili nekim drugim kritičnim atributima specifičnima za proizvodni proces. Primjerice, QC metodom mora se identificirati proizvod koji je neadekvatno granuliran ili neadekvatno komprimiran, a njome se moraju otkriti i bitne promjene kritičnih atributa djelatne tvari ili ključnih pomoćnih tvari. QC metoda treba biti robusna i jednostavna za primjenu u tipičnom QC okruženju [28]. Kloridna kiselina, acetatni i fosfatni pufer u fiziološkom pH području najčešće su upotrebljavani *in vitro* mediji. Pročišćena voda, iako prihvatljiva, nije preporučljiv *in vitro* medij ponajprije zbog ograničenoga puferskog kapaciteta [29]. Puferski se mediji trebaju

uzeti u obzir kada su djelatna ili pomoćna tvar osjetljive na pH. Slabo topljive djelatne tvari koji se ne mogu adekvatno otopiti u vodenim medijima u fiziološkom pH području zahtijevaju dodatak surfaktanta koji će stvoriti uvjete osigurane topljivosti i omogućiti postizanje potpunog oslobađanja lijeka u odgovarajućem vremenu. Osim toga, surfaktanti mogu povećati brzinu oslobađanja povećavajući močivost hidrofobnih djelatnih ili pomoćnih tvari [27]. *In vitro* medij s dodatkom surfaktanta ne smatra se odstupanjem od fizioloških uvjeta s obzirom na zastupljenost žučnih soli i lecitina u crijevnom sadržaju, ali količina surfaktanta koja se doda u *in vitro* medij mnogo je veća od fiziološke koncentracije, pa se često ne može uspostaviti korelacija s *in vivo* podatcima [30, 31].

Biorelevantna metoda

Biorelevantna metoda razvija se radi oponašanja fizioloških uvjeta kojima je izložen lijek tijekom prolaska kroz gastrointestinalni trakt. Metodom se karakterizira oslobađanje lijeka i odabire optimalna formulacija. Korištenje takve metode važno je tijekom inicijalne faze razvoja lijeka radi predviđanja mogućeg utjecaja hrane na oslobađanje lijeka, kao i utjecaja inhibitora protonske pumpe i moguće precipitacije lijeka nakon oralne primjene [28].

Dressman i suradnici predložili su sastav *in vitro* biorelevantnih medija koji najbolje simuliraju želučani i crijevni sadržaj, uzimajući u obzir glavne činitelje koji utječu na *in vivo* oslobađanje lijekova [23]. Osmolalnost, površinska napetost, puferski kapacitet, pH te koncentracija lecitina i natrij taurokolata u biorelevantnim medijima prilagođeni su fiziološkim vrijednostima. Mediji koji simuliraju sadržaj i uvjete u želudcu jesu: SGF (engl. *simulating gastric fluid*) uz dodatak surfaktanta, FaSSGF (engl. *fasting simulating gastric fluid*, simulacija želudčanog soka bez hrane), te punomasno mlijeko s 3,5-postotnim udjelom masti za simulaciju uvjeta u želudcu nakon obroka [23, 32]. Za simuliranje uvjeta u crijevima u uvjetima bez hrane ili s njom rabe se mediji FaSSIF (engl. *fasting simulating intestinal fluid*, simulacija crijevnog soka bez hrane) i FeSSIF (engl. *fed simulating intestinal fluid*, simulacija crijevnog soka s hranom). Sastav biorelevantnih medija koji simuliraju uvjete u crijevu u kojemu ima hrane i u praznom crijevu, modificiran prema Jantratid i suradnicima, prikazan je u **tablici 3** [33].

Tablica 3. Sastav biorelevantnog *in vitro* medija u tankome crijevu [preuzeto i prilagođeno prema 33 uz dozvolu Springer Nature]

Sastav	**FaSSIF**	**FeSSIF**
žučne soli (natrijev taurokolat) (mM)	3	10
fosfolipidi (lecitin) (mM)	0,2	2
maleinska kiselina (mM)	19,12	55,02
natrijev hidroksid (mM)	34,8	81,65
natrijev klorid (mM)	68,62	125,5
gliceril monooleat (mM)	/	5
natrijev oleat (nM)	/	0,8
pH	6,5	5,8
osmolalnost (mOsmL/kg)	180 ± 10	390 ± 10
puferski kapacitet (mmol/L/ΔpH)	10	25

Biorelevantnom se metodom katkad ne može predvidjeti ponašanje lijeka u organizmu te je uglavnom skupa, kompleksna, nedovoljno robusna i ne može se postići oslobađanje više od 80 % djelatne tvari u određenom vremenu, što limitira primjenu te metode kao QC metode [28].

Klinički relevantna metoda

Pojam klinički relevantne metode uveden je unutar koncepta kvalitete ugrađene u dizajn (engl. *quality by design*-QbD) kako bi se bolje razumio utjecaj procesnih i formulacijskih varijacija na *in vivo* rezultate. Klinički relevantna metoda određuje se povezivanjem rezultata dobivenih ispitivanjem *in vitro* oslobađanja lijeka i dobivenih *in vivo* farmakokinetičkih parametara te uspostavljanjem *in vitro – in vivo* korelacije ili relacije (engl. *IVIVC* ili *IVIVR*). Tijekom razvoja lijekova u odabiru metoda za ispitivanje *in vitro* oslobađanja lijekova pomaže klasifikacija BCS. Prema smjernicama američke regulative, ako se formulacije lijeka s trenutačnim oslobađanjem i dobro topljivom djelatnom tvari vrlo brzo oslobađaju (više od 85 % djelatne tvari unutar 15 minuta za BCS klasu 1.) ili imaju sličan profil oslobađanja (85

% djelatne tvari otopljene unutar 30 minuta za BCS klasu 3.) u propisanim *in vitro* medijima (pH 1,2; 4,5 i 6,8), ti se mediji smatraju klinički relevantnima i ne treba provoditi bioekvivalencijsko ispitivanje [4, 18, 28]. Za formulacije s trenutačnim oslobađanjem koje sadržavaju djelatne tvari BCS klase 2. i 4. vrlo je izazovno standardizirati metode ispitivanja *in vitro* oslobađanja lijekova. Stoga je za slabo topljive djelatne tvari važno ispitati utjecaj različitih formulacija, procesnih uvjeta na *in vivo* farmakokinetički profil i dizajnirati *in vitro* metodu koja može identificirati promjene uvedene tijekom razvoja lijekova. Klinički relevantna *in vitro* metoda može biti provedena u nebiorelevantnom *in vitro* mediju ako se može potvrditi da dobro predviđa *in vivo* ponašanje lijeka [18, 20, 34]. Primjena te metode kao QC metode za slabo topljive djelatne tvari omogućuje potvrdu adekvatnoga *in vivo* profila nakon oralne primjene lijeka [28].

Također, QC metoda i biorelevantna metoda mogu biti klinički relevantne ako se uspostavi neki oblik povezanosti *in vitro* i *in vivo* rezultata, npr. IVIVC ili IVIVR [28].

2.1.3.4. Modeliranje i usporedba profila *in vitro* oslobađanja

Tijekom posljednja dva desetljeća predloženi su različiti modeli za karakterizaciju profila oslobađanja. *In vitro* oslobađanje iz čvrstih farmaceutskih oblika može se opisati model neovisnom metodom koja se koristi dvama statističkim faktorima ili kinetičkim modelima u kojima je količina otopljene djelatne tvari u funkciji vremena *t* (reakcija nultoga i prvog reda) [35].

2.1.3.4.1. Model-neovisne metode

Dvije najčešće primjenjivane metode jesu izračun faktora sličnosti i faktora različitosti.

Faktor različitosti f_1 odražava postotak greške između profila testirane i referentne formulacije u svakoj vremenskoj točki *in vitro* ispitivanja i definira se jednadžbom:

$$f_1 = \frac{\sum_{j=1}^{n} |R_j - T_j|}{\sum_{j=1}^{n} R_j} \times 100 \quad (6)$$

Vrijednosti R_j i T_j označavaju postotak otopljene djelatne tvari testirane i referentne formulacije u svakoj vremenskoj točki j. Kada je f_1 jednak nuli, znači da su ta dva ispitivana profila identična [35].

Faktorom sličnosti f_2 iskazuje se sličnost u postotku otopljene djelatne tvari između dviju formulacija i definirana je jednadžbom:

$$f_2 = 50 \times log\left\{\left[1 + (1/n)\sum_{j=1}^{n} |R_j - T_j|^2\right]^{-0.5} \times 100\right\} \quad (7)$$

Pritom R_j i T_j predočuju postotak otopljene djelatne tvari testirane i referentne formulacije u svakoj vremenskoj točki j. Broj vremenskih točaka označen je malim slovom n [35].

Prema regulatornim smjernicama (FDA, EMA), faktor sličnosti je kriterij utvrđivanja sličnosti između dvaju profila *in vitro* oslobađanja. Dva se profila smatraju sličnima ako faktor sličnosti ima vrijednost između 50 i 100 [4, 5].

2.1.3.4.2. Model-ovisne metode

Kvantitativno tumačenje rezultata dobivenih *in vitro* može se dobiti uz pomoć jednadžbe koja matematički opisuje krivulju oslobađanja kao funkciju određenih parametara povezanih s svojstvima ispitivanoga farmaceutskog oblika. U nekim se slučajevima jednadžba može izvesti iz teoretske analize procesa, kao kinetika nultog reda. Međutim, u većini primjera koji su primjenjivi za tablete, kapsule, oblike s kontroliranim oslobađanjem teoretskih temelja nema i rabe se mnogo primjenjivije empirijske jednadžbe. Empirijski modeli najčešće su predočeni jednostavnim jednadžbama, a njihov je cilj samo opis ponašanja sustava na makroskopskoj razini, neovisno o pozadini tog ponašanja na mikroskopskoj razini [35]. Brojni su matematički modeli predloženi za opisivanje krivulje oslobađanja lijeka, npr. Weibullov model, Higuchijev model, Korsmeyer-Peppasov model, jednostavna varijanta eksponencijalnog modela itd.

Jednostavna varijanta eksponencijalnog modela opisuje se ovom formulom [35]:

$$f_{dis}(t) = a \cdot (1 - e^{-\lambda \cdot t}) \tag{8}$$

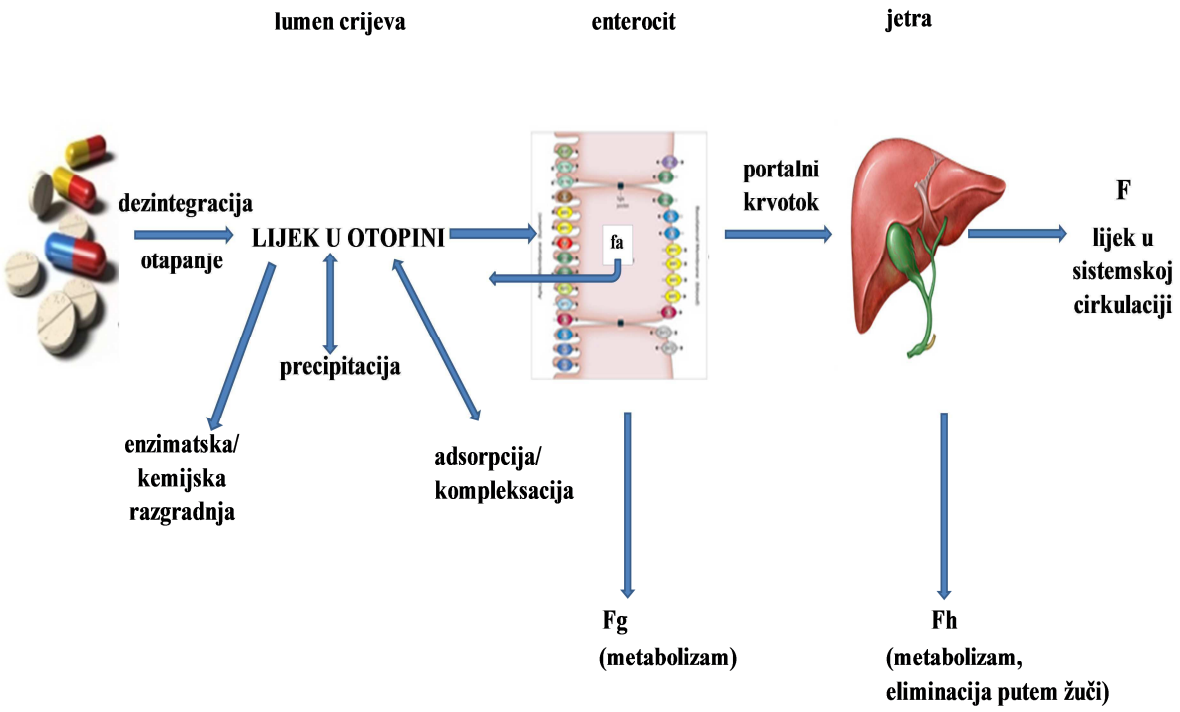
Parametri a i λ određuju se prilagođivanjem modela podatcima koji su izmjereni *in vitro*.

2.2. Oralna primjena lijekova

Najveći broj lijekova primjenjuje se oralnim putem, i to je pacijentima najprihvatljiviji način uzimanja lijeka. Da bi se ostvario terapijski učinak djelatne tvari iz oralno primijenjenoga čvrstog farmaceutskog oblika, djelatna se tvar mora apsorbirati, a proces apsorpcije sastoji se od nekoliko koraka:

- oslobađanje djelatne tvari iz farmaceutskog oblika
- otapanje djelatne tvari
- prijenos djelatne tvari preko membrane gastrointestinalnog trakta u sistemsku cirkulaciju.

Bioraspoloživost je farmakokinetički parametar i označava brzinu i opseg djelatne tvari koja dospije u sistemsku cirkulaciju i postane dostupan za farmakološko djelovanje. Bioraspoloživost lijeka određuju frakcija apsorbiranog lijeka i frakcija koja izbjegne metabolizam u enterocitima i jetri. **Slika 3** prikazuje procese uključene u oslobađanje i apsorpciju lijekova iz čvrstih farmaceutskih oblika.



Slika 3. Prikaz procesa koji mogu utjecati na bioraspoloživost oralno primijenjenog lijeka

Tri parametra koja uvjetuju oralnu bioraspoloživost (***F***) prikazana su u jednadžbi:

$$F = f_a \times F_g \times F_h \tag{9}$$

u kojoj je f_a frakcija doze lijeka koji se apsorbira iz lumena crijeva u enterocite, F_g frakcija doze lijeka koja izbjegne predsistemski metabolizam u enterocitima, a F_h frakcija lijeka koja prolaskom kroz jetru izbjegne predsistemski metabolizam u njoj [36].

Bioraspoloživost lijeka može biti apsolutna i relativna, a definirana je krivuljom koncentracije lijeka u vremenu unutar sistemske cirkulacije. Apsolutna bioraspoloživost odnosi se na usporedbu intravenske primjene i neintravenske primjene lijeka. Ako se lijek primijeni intravenski, bioraspoloživost iznosi 100 %, no kad se primjeni na alternativni način (npr. peroralno), apsolutna bioraspoloživost izračunava se kao omjer površine ispod koncentracijske krivulje (npr. oralne) nasuprot površini ispod koncentracijske krivulje nakon intravenske primjene (IV) prema jednadžbi:

$$F_{aps} = \frac{PIK_{oralno}}{PIK_{IV}} \times \frac{D_{IV}}{D_{oralno}} \tag{10}$$

gdje PIK označava površinu ispod koncentracijske krivulje u vremenu oralno i intravenski primijenjenog lijeka, a D primijenjenu dozu lijeka.

Relativna bioraspoloživost obuhvaća svaku drugu usporedbu bioraspoloživosti poput usporedbe istoga farmaceutskog oblika dvaju različitih proizvođača ili različitih neintravenskih oblika istog proizvođača (npr. tableta i otopina) prema jednadžbi:

$$F_{rel} = \frac{PIK_{testni\ lijek}}{PIK_{referentni\ lijek}} \times \frac{D_{referentni\ lijek}}{D_{testni\ lijek}} \quad (11)$$

Gdje je PIK površina ispod koncentracijske krivulje u vremenu za testirani i referentni lijek, a D primijenjena doza lijeka [25].

Relativna bioraspoloživost mjeri se tijekom provedbe bioekvivalencijskih studija. Prema definiciji, dva su lijeka bioekvivalentna ako farmaceutski ekvivalenti primijenjeni u istome molarnom iznosu u sličnim uvjetima i dobro dizajniranom pokusu ne pokazuju značajne razlike u brzini i opsegu dostupnosti djelatne tvari u sistemskoj cirkulaciji.

Farmakokinetički parametri koji pokazuju brzinu i obim apsorpcije lijeka iz farmaceutskog oblika u sistemsku cirkulaciju jesu:

- vršna koncentracija (cmax)
- površina ispod krivulje (PIK).

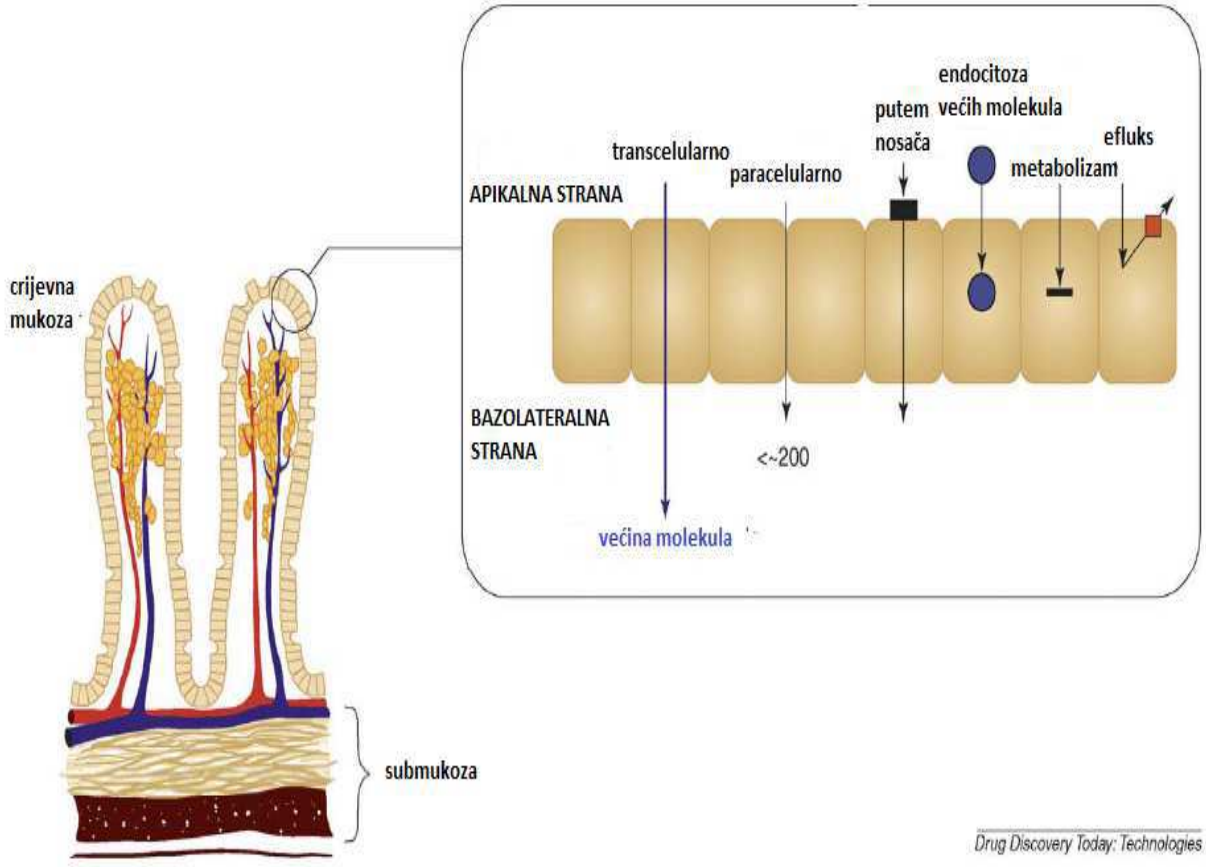
Bioekvivalencija je dokazana ako je 90-postotni interval pouzdanosti omjera testiranoga i referentnog lijeka dobivenoga za vršnu koncentraciju i površine ispod krivulje unutar raspona od 80,00 do 125,00 % [4, 5].

2.3. Apsorpcija lijeka nakon oralne primjene

Apsorpcija lijeka složen je proces na koji utječu mnogi činitelji koji se mogu svrstati u tri kategorije [37]. Prva se kategorija sastoji od fizioloških činitelja u gastrointestinalnom traktu; to su pH, pražnjenje želudca, vrijeme prolaska kroz tanko i debelo crijevo, sastav probavnih sokova, način apsorpcije i presistemski metabolizam. Drugoj kategoriji pripadaju fizikalno-kemijski parametri djelatne tvari kao što su pKa, topljivost, stabilnost, lipofilnost. U treću se kategoriju ubrajaju biofarmaceutski činitelji vezani za formulaciju lijeka, npr. veličina čestica, kristalni oblik, vrsta farmaceutskog oblika [38].

2.3.1. Mehanizmi apsorpcije lijekova

Glavna funkcija biološke barijere intestinalnih stanica jest apsorpcija tvari nužnih za normalno funkcioniranje organizma te zaštita tkiva i organa od štetnih tvari. Esencijalne tvari potrebne organizmu apsorbiraju se različitim mehanizmima koji se mogu iskoristiti i za apsorpciju lijekova. **Slika 4** prikazuje različite mehanizme apsorpcije lijekova kroz biološke membrane.



Slika 4. Mehanizmi apsorpcije lijekova [preuzeto i prilagođeno prema 39 uz dozvolu Elsevier]

Nakon oralne primjene lijek se može apsorbirati pasivnom difuzijom ili aktivnim transportom.

Transcelularni način glavni je put apsorpcije većine lijekova, a uvjetovan je fizikalno-kemijskim svojstvima djelatne tvari, ali i obilježjima epitelne membrane. Apikalna se membrana enterocita smatra ograničavajućim činiteljem tijekom pasivne difuzije jer je deblja i rigidnija od bazolateralne membrane [40, 41]. Paracelularni način dosta je ograničen jer mu pripada manje od 0,01 % ukupne apsorptivne površine crijeva [42]. Najviše je hidrofilnih pora između enterocita u tankom crijevu, dok ih u debelom crijevu nema [36].

Aktivni se prijenos lijekova ostvaruje uz pomoć transportera, uz utrošak energije, a dijeli se na influks i efluks. Većina transportera nalazi se na apikalnoj strani membrane enterocita, a neki se nalaze samo na bazelateralnoj strani ili mogu postojati s obje strane membrane enterocita. Lijekovi koji se apsorbiraju putem transportera uglavnom imaju neke strukturne sličnosti s endogenim tvarima koje su supstrat za određeni transportni protein. Transporteri su vrlo specifični i s obzirom na to da postoji određen broj transportnih proteina, taj se transportni put može zasititi [43]. Takav tip transporta mnogo je važniji za hidrofilne lijekove i može biti glavni mehanizam apsorpcije lijekova jer je manje vjerojatno da će se apsorbirati transcelularno, dok se lipofilni lijekovi koji se mogu apsorbirati putem transportera zbog svoje lipofilnosti mogu apsorbirati i transcelularno, pa je utjecaj transportera minimalan [36].

2.3.2. Anatomija i fiziologija probavnog sustava

Sastavni dijelovi probavnog sustava razlikuju se po svojoj anatomskoj strukturi, vremenu prolaska lijeka kroz njih, sekreciji i pH.

Lijekovi koji se uzimaju oralno ne apsorbiraju se u jednjaku zbog vrlo brzog prolaska (10 sekundi) i male apsorptivne površine [44].

Želudac ima relativno malu apsorptivnu površinu, za razliku od tankog crijeva, i kratko vrijeme prolaska kad se lijek uzme na prazan želudac. Time se može objasniti ograničena uloga u želudca u apsorpciji lijekova, ali su pH i pražnjenje želudca vrlo važni za otapanje i apsorpciju lijekova u tankom crijevu jer pražnjenje želudca utječe na brzinu dolaska lijeka u tanko crijevo, koje je glavno mjesto apsorpcije većine lijekova. Osim regularnih, toničkih kontrakcija koje se zbivaju kad se hrana nalazi u želudcu, kad u njemu nema hrane, svaka se

dva sata ponavljaju multifazni motorički ciklusi (MMC) koji prazne sadržaj želudca u dvanaesnik. Pražnjenje želudca pri oralnoj primjeni lijeka ovisi o farmaceutskom obliku i sadržaju želudca. Kad se lijek uzima na prazan želudac, male se čestice (manje od 2 mm) tijekom svih faza MMC-a mogu isprazniti iz želudca, uz poluvijek pražnjenja kraće od jednog sata. Veće se čestice (2 – 7 mm) mogu isprazniti u drugoj i trećoj fazi, kada se pojavljuju snažne kontrakcije (engl. *house keeping waves*) [44, 45]. Pražnjenje želudca dosta je varijabilan parametar koji se ne razlikuje samo u pojedinih ljudi (intervarijabilnost) već i u iste osobe može varirati u dva različita razdoblja (intravarijabilnost) [46]. Kada nema hrane, pH želudca iznosi 1 – 3 i u njemu je 30 – 50 ml tekućine koja sadržava ione klorida. Oni stvaraju kiselo okruženje; pepsin koji pomaže u probavi hrane; lipaze koje pridonose oslobađanju lijekova iz lipidnih farmaceutskih oblika, male količine žučnih soli te natrijevih i kalijevih iona [47, 48, 49, 50]. Uzimanjem hrane dolazi do porasta pH, lučenja probavnih enzima te dužeg zadržavanja lijeka ovisno o vrsti obroka. Prosječan pH želudca nakon uzimanja obroka iznosi 4 – 7 i vraća se na početne vrijednosti nakon otprilike jednog sata, ovisno o količini kalorija, sastavu hrane i vrijednosti pH. Uzimanjem tekućeg obroka, pH u želudcu dulje vrijeme ostaje povišen (više od četiri sata) nego nakon krutog obroka [44].

Tanko crijevo dugačko je oko tri metra, ali zajedničkim se učinkom kružnih nabora, resica i mikroresica znatno povećava njegovo apsorpcijsko područje. Premda se u većini literature spominje apsorptivna površina od oko 250 m^2, novija istraživanja navode da je ta površina znatno manja i iznosi 32 m^2 [47]. Dobro permeabilne djelatne tvari uglavnom se apsorbiraju na vršcima vilija [51], a slabo permeabilne djelatne tvari mogu difundirati cijelom duljinom tankog crijeva, od vrška vilija do kripte, što povećava raspoloživu apsorptivnu površinu [52, 53]. Nakon što prođu enterocite i laminu propriju, molekule lijeka ulaze u krvotok (portalnu venu). Mali broj jako lipofilnih djelatnih tvari ulazi u sistemsku cirkulaciju putem limfe u tankom crijevu [54]. Uz mukozu se nalazi stacionarni vodeni sloj vode, sluzi i glikokaliksa, koji nastaje nepotpunim miješanjem crijevnih sadržaja uz crijevnu mukoznu površinu čija debljina u ljudi iznosi 25 μm [55, 56]. Utjecaj stacionarnog vodenog sloja na apsorpciju lijekova neznatan je [56, 57, 58]. Kad nema hrane, pH u tankom crijevu prosječno iznosi 6,5, a ako u crijevu ima hrane, pH se snižava i iznosi oko 5. Prosječno vrijeme prolaska lijeka kroz tanko crijevo u zdravih ljudi iznosi oko 3 – 5 sati i ne mijenja se uzimanjem hrane ili ovisno o farmaceutskom obliku [37, 44]. Pasivna je transcelularna apsorpcija lijekova efikasnija u proksimalnom dijelu tankog crijeva [44].

Sluznica debelog crijeva slična je sluznici tankog crijeva, ali u njoj nema resica. U debelom se crijevu nalaze mnoge aerobne i anaerobne bakterije koje imaju probavne i metaboličke funkcije i mogu uzrokovati razgradnju lijekova. U debelom su crijevu pH vrijednosti nešto niže nego u tankome, što je vjerojatno posljedica fermentacije zbog djelovanja bakterija u njemu [36]. Premda debelo crijevo ima manju apsorptivnu površinu, apsorpcija lijekova može biti učinkovita zbog duljega vremena prolaska lijeka. U nastavku debelog crijeva apsorpcija vode poveća viskoznost sadržaja crijeva, što uzrokuje slabije miješanje, sporiju topljivost i smanjuje mogućnost doticaja lijeka s apsorptivnom površinom. Procijenjeno vrijeme prolaska kroz proksimalni dio debelog crijeva iznosi 5 – 12 sati, a vrijeme prolaska kroz ostali dio debelog crijeva dosta je varijabilno [44].

2.3.2.1. Svojstva gastrointestinalnih tekućina

Puferski kapacitet, pH, osmolalnost, površinska napetost, viskoznost, volumen i temperatura tekućina u gastrointestinalnom traktu utječu na *in vivo* učinak farmaceutskog oblika. Dokazano je, primjerice, da osmolalnost djeluje na oslobađanje lijeka, da efekt zajedničkog iona može rezultirati sporijim otapanjem, da površinska napetost može utjecati na svojstva močivosti formulacije te da žučne soli i fosfolipidi mogu smanjiti površinsku napetost gastrointestinalnih tekućina, dok temperatura može djelovati na difuzijski koeficijent lijeka te na topljivost same formulacije i djelatne tvari (**tablica 4**) [33, 48, 59, 60, 61, 62].

Hrana sadržava aminokiseline, masti i mnoge nutrijente koji mogu utjecati na vrijeme pražnjenja želudca, povećanje krvnog protoka u jetri, stimulaciju izlučivanja žuči, promjene pH u gastrointestinalnom traktu te na fizikalno-kemijske interakcije s lijekom. U nekim slučajevima hrana može imati negativan učinak na bioraspoloživost lijekova zbog vezanja lijeka za komponente hrane ili hrana može stvarati fizičku barijeru koja sprečava difuziju djelatne tvari na mjestu apsorpcije, dok katkad zbog poboljšanja topljivosti djelatne tvari znatno povećava bioraspoloživost lijeka pa se lijek uzima samo uz hranu [63].

Tablica 4. Svojstva gastrointestinalnih tekućina [64, 65, 66]

Parametar		**Vrijednosti bez prisutnosti hrane**	**Vrijednosti nakon uzimanja hrane**
volumen vode (ml)	želudac	< 50	do 1000
	tanko crijevo	105	54
pH	želudac	1,7 – 3,3	3,5
	tanko crijevo	5,6 – 7 (duodenum) 6,0 – 7,8 (jejunum) 6,5 – 8 (ileum)	5 – 6,5 (duodenum) 5 – 6,5 (jejunum) 6,5 – 8 (ileum)
	kolon	7,8	6
osmolalnost (mOsm/kg)	želudac	171-276	217 – 559
	tanko crijevo	124 – 266 (duodenum) 200 – 278 (jejunum)	250 – 367 (duodenum)
	kolon	81]	99 – 349]
površinska napetost (mN/m)	želudac	41,9-45,7	30 – 31
	tanko crijevo	33,3 – 46 (duodenum) 28 (jejunum)	32,2 – 36,7 (duodenum); 27 (jejunum)
	kolon	42,7]	
puferski kapacitet (mmol/l/ΔpH)	želudac	7 – 18	14 – 28
	tanko crijevo	5,6 (duodenum) 3,2 (jejunum) 6,4 (ileum)	18 – 30 (duodenum) 13,2 – 14,6 (jejunum)
enzimi	želudac	pepsin: 0,1 – 1,3 mg/ml; lipaza: 43,9 U/ml	pepsin: 0,26 – 1,72 mg/ml lipaza: 11,4 – 43,9 U/ml
žučne soli (mM)	tanko crijevo	2,5 – 5,9 (duodenum) 1,4 – 5,5 (jejunum)	3,6 – 24 (duodenum) 4,5 – 8 (jejunum)
fosfolipidi (mM)	tanko crijevo	0,26 (duodenum) 0,19 (jejunum)	1,2 – 6 (duodenum) 2 – 3 (jejunum)

2.3.2.2. Predsistemski metabolizam lijekova

Zbog efluks transportera u crijevima, metabolizma u enterocitima (metabolizma faze I. i II.), efekta prvog prolaska kroz jetru i razgradnje lijeka u lumenu crijeva može doći do znatnog smanjenja apsorbirane frakcije lijeka. U enterocitima se nalaze citokromi CYP1A2, 2A6, 3B6, 2C, 2D6, 2E1 i 3A izoforma. Premda je količina citokroma u crijevima znatno niža od one u jetri, crijevni su enzimi strateški postavljeni tako da se maksimalno poveća izloženost crijevnog sadržaja enzimima. Koncentracije enzima P450 najveće su na vršcima vilija prve i druge trećine tankog crijeva [67]. Citokrom P450 3A4 i P-gp često su zajedno locirani na apikalnoj strani vršaka vilija te ih aktiviraju ili inhibiraju iste tvari i imaju jednaku specifičnost za supstrate. Njihovom koordiniranom aktivnošću lijekovi koji su supstrati za CYP3A4 kontinuirano kruže između enterocita i lumena crijeva i tako povećavaju izloženost lijeka enzimu. Crijevna mikroflora može povećati apsorpciju lijekova koji su podložni enterohepatičkoj recirkulaciji [67].

2.3.3. Fizikalno-kemijski činitelji koji utječu na apsorpciju lijekova

Topljivost i permeabilnost dva su glavna fizikalno-kemijska činitelja koja utječu na apsorpciju lijekova, a ostali fizikalno-kemijski faktori djelatne tvari (npr. stupanj ionizacije, molekulska masa, logP i slobodne rotirajuće veze) određuju topljivost i permeabilnost.

Prema Lipinskijevu pravilu, dobra se apsorpcija lijeka može očekivati ako molekula ima manje od pet donora vodikovih veza (-NH ili OH skupine), manje od deset akceptora vodikove veze (atomi kisika i dušika, uključujući one koji su i donori vodikovih veza), molekularnu masu manju od 500 i lipofilnost ($\log P < 5$). Također se koristi i polarna površina (PSA), koja dobro korelira s pasivnim prijenosom lijeka kroz membrane [68].

2.3.3.1. Topljivost

Da bi lijek prošao kroz biološku membranu, mora biti u otopljenome i neioniziranom stanju, pri čemu i razlike pH vrijednosti u različitim dijelovima gastrointestinalnog trakta mogu utjecati na otapanje ili razgradnju djelatne tvari.

Važan činitelj koji utječe na apsorpciju lijekova nakon oralne primjene jest pH raspodjela. U tom procesu Henderson-Hasselbackova jednadžba opisuje odnos između pKa vrijednosti djelatne tvari, pH medija i udjela ioniziranog dijela za slabe kiseline i za slabe baze.

Slabo kisele djelatne tvari lošije se otapaju u želudcu, gdje se nalaze uglavnom u neioniziranom stanju, no nakon dolaska u tanko crijevo njihovo je otapanje mnogo brže i većim su dijelom u ioniziranom obliku. Slabo lužnate djelatne tvari brzo se otapaju i u kiselom pH želudca uglavnom su u ioniziranom obliku, dok je njihovo otapanje u uvjetima višega pH u tankom crijevu sporije i većinom su u neioniziranom stanju. Uzimanjem hrane s lijekom koji je slaba baza može se smanjiti brzina otapanja lijeka jer dolazi do povišenja želudčanog pH. Za lijekove koji su slabe kiseline hrana može povećati udio lijeka u ioniziranom obliku čineći ga tako bolje topljivim [67].

Osim pH i pKa vrijednosti, procjena topljivosti može se odrediti iz kemijske strukture. Topljivost je direktno povezana s brojem vodikovih veza koje se mogu formirati s vodom [69]. Delaney je napravio linearnu regresiju s devet molekularnih karakteristika. Najvažniji su učinak imali logP, molekularna masa, udio teških atoma u aromatskoj strukturi te broj rotirajućih veza [70].

2.3.3.2. Permeabilnost

Sposobnost lijeka da difundira kroz lipidnu membranu ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima djelatne tvari, što podrazumijeva logP, molarnu masu, Van der Wallsove sile i molekularnu fleksibilnost stvaranja vodikovih veza. Lipofilne molekule (optimalan logP je u području 2 – 7) i molarne mase > 300 g/mol [36, 44] dominantno će se apsorbirati transcelularno, dok će se paracelularnim putem apsorbirati hidrofilne molekule (logP < 0) male molarne mase (manje od 250 g/mol) [44].

2.3.4. Biofarmaceutski činitelji koji utječu na apsorpciju lijekova

Apsorpcija iz oralnih otopina je brza, dok različite formulacije lijeka s trenutačnim ili modificiranim oslobađanjem mogu, među ostalim, utjecati i na vrijeme prolaska lijeka kroz gastrointestinalni trakt [61, 71]. Mikronizacijom ili nanonizacijom, kojom se veličina čestica može smanjiti na 100-250 nm, povećava se površina čestice koja je dostupna za otapanje, čime se ubrzava otapanja lijeka [36, 72].

Mnogi se lijekovi mogu klasificirati kao slabe baze ili slabe kiseline koje teže ionskim interakcijama sa suprotno nabijenim ionima. Stvaranjem soli dolazi do promjene pH difuzijskog sloja na površini čestice koja se otapa, što znatno povećava topljivost djelatne tvari [36].

Različiti polimorfni oblici imaju različita fizikalna svojstva kao što su kristalni oblik, molekularna gustoća, temperatura taljenja, higroskopnost i entalpija fuzije. Polimorfizam može utjecati na fizikalnu i kemijsku stabilnost te na profil topljivosti Amorfni oblici uglavnom imaju veću brzinu otapanja i veću topljivost od njihovih kristalnih oblika. Međutim, amorfni su oblici uglavnom kemijski nestabilniji zbog nedostatka trodimenzionalne kristalne strukture i veće molekularne pokretljivosti [36, 72].

Odabir formulacije, pomoćnih tvari i proizvodnog procesa također može uvelike utjecati na bioraspoloživost lijeka. Premda su se pomoćne tvari u formulacijama tradicionalno smatrale inertnima, iskustvo je pokazalo da mogu imati važne interakcije s djelatnom tvari i utjecati na njezinu apsorpciju i bioraspoloživost. Većina interakcija između djelatne i pomoćnih tvari utječe na proces dezintegracije i/ili oslobađanja, dok u manjem broju slučajeva interakcija pomoćne tvari i djelatne tvari može utjecati na pH mikrookoline, stabilnost djelatne tvari u gastrointestinalnom traktu, vrijeme prolaska kroz gastrointestinalni trakt i na permeabilnost gastrointestinalne membrane, što također može utjecati na bioraspoloživost lijeka. Djelatnim tvarima koje imaju slabu topljivost moraju se dodati pomoćne tvari kao što su surfaktanti ili sredstva za močivost (engl. *wetting agents*), koji ubrzavaju oslobađanje lijeka [73, 74].

2.3.5. Osnove farmakokinetike i farmakokinetički modeli

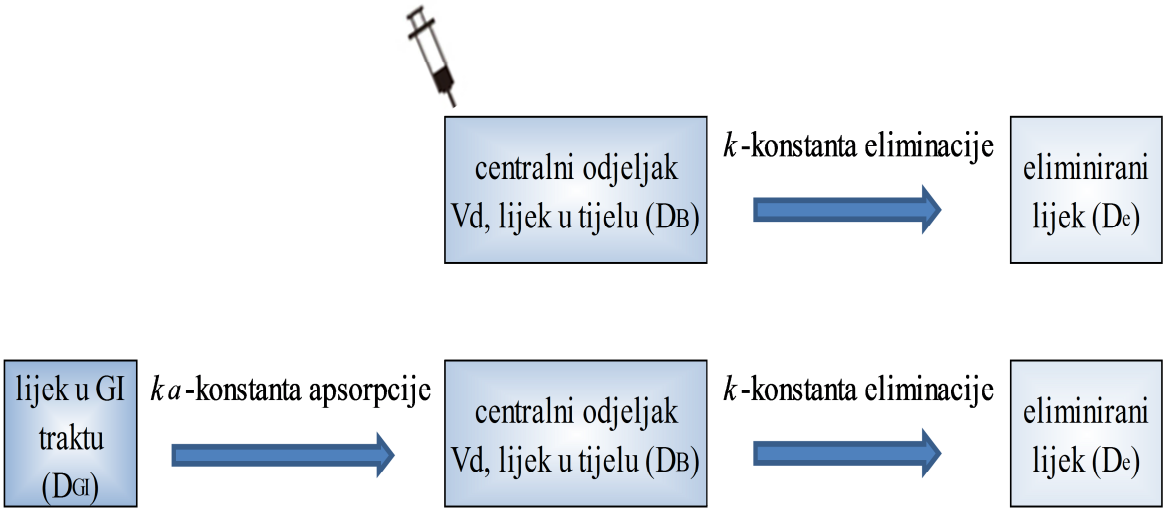
Za kvantitativan prikaz procesa apsorpcije, distribucije i eliminacije lijeka mogu se upotrebljavati različiti matematički modeli. Oni omogućuju da se primjenom jednadžbi opiše koncentracija lijeka u krvi u ovisnosti o vremenu, premda uvelike simplificiraju niz složenih procesa koji se istodobno zbivaju u organizmu. Brzina farmakokinetičkog procesa određuje se uz pomoć diferencijalne jednadžbe kojom se izračunava brzina procesa u bilo kojem trenutku. Pri apsorpciji, distribuciji i eliminaciji lijekova brzina navedenih farmakokinetičkih procesa proporcionalna je koncentraciji lijeka, tj. što je veća koncentracija, ti su procesi brži. Farmakokinetičkom terminologijom, riječ je o procesima prvog reda. Procesi u kojih brzina ne ovisi o koncentraciji nazivaju se procesima nultog reda. Broj parametara koji je potreban da se opiše proces ovisi o kompleksnosti procesa i načinu primjene lijeka [25].

Ljudsko se tijelo može predočiti uz pomoć jednoga ili više prostornih odjeljaka koji su međusobno povezani. Prostor nije stvarna fiziološka i anatomska cjelina već obuhvaća tkivo ili skupine tkiva koja imaju sličan protok krvi ili afinitet prema lijekovima. Osim prostornih modela, postoje i fiziološki, koji su utemeljeni na anatomskim i fiziološkim podatcima [25].

2.3.5.1. Jednoprostorni model

Jednoprostorni model najjednostavnije opisuje proces distribucije i eliminacije lijeka iz organizma. Primjenom lijeka intravenskim bolusom, cijela doza lijeka izravno ulazi u krvotok pa se proces apsorpcije i distribucije lijeka u jednoprostornome modelu smatra trenutačnim. Lijek se nakon primjene brzo raspoređuje u tijelu, ali koncentracija lijeka u svakom tkivu može biti različita zbog različitog afiniteta tkiva prema tom lijeku. Nije moguće mjeriti koncentraciju u svakom pojedinom tkivu, ali nakon uspostavljanja ravnoteže koncentracija lijeka u tkivima odražava se u koncentraciji lijeka u krvi. Prividni volumen distribucije parametar je koji utječe na koncentraciju lijeka u krvi nakon primijenjene doze. Drugi parametar koji se određuje jednoprostornim modelom jest konstanta eliminacije, koja utječe na brzinu smanjenja koncentracije lijeka tijekom vremena.

Slika 5 prikazuje jednoprostorni model koji opisuje distribuciju i eliminaciju lijeka nakon primjene intravenskog bolusa i nakon oralne primjene lijeka.



Slika 5. Model s jednim prostorom nakon primjene intravenskog bolusa i oralne primjene lijeka

Pretpostavlja se da se nakon oralne primjene lijekova u obliku otopine ili tableta/kapsula s trenutačnim oslobađanjem apsorpcija ostvaruje procesom prvog reda. Većina farmakokinetičkih modela pretpostavlja apsorpciju prvog reda osim ako apsorpcija nultog reda nije eksperimentalno dokazana ili znatno poboljšava model. Intramuskularne se vodene injekcije također mogu opisati procesom prvog reda [25].

Brzina promjene količine lijeka u tijelu (dD_B/dt) jednaka je razlici brzine apsorpcije kojom lijek ulazi u tijelo (dD_{GI}/dt) i brzine eliminacije kojom se lijek izbacuje iz tijela (dD_E/dt). S obzirom na to da se apsorpcija iz gastrointestinalnog trakta zbiva procesom prvog reda, količina lijeka na mjestu apsorpcije (dD_{GI}) može se izraziti kao $D_0 e^{-k_a t}$ te se koncentracija lijeka u krvi u bilo kojem vremenu t može izračunati uz pomoć jednadžbe:

	$c_p = \frac{F k_a D_0}{V_d(k_a - k)}(e^{-kt} - e^{-k_a t})$ -- » $c_p = A(e^{-kt} - e^{-k_a t})$	(12)

u kojoj je F frakcija lijeka koja se apsorbira u organizam, V_d volumen distribucije, D_0 doza lijeka, k_a konstanta apsorpcije, a k konstanta eliminacije.

Iz grafičkog prikaza logaritamskih vrijednosti koncentracije lijeka u vremenu, nagib pravca u zadnjim vremenskim točkama krivulje (vrijednosti koncentracije na logaritamskoj skali, a vrijeme na linearnoj skali) daje konstantu eliminacije, a odsječak na osi y jednak je $\frac{Fk_aD_0}{V_{d(k_a-k)}}$ [25].

2.4. *In vitro – in vivo* korelacija

In vitro – in vivo korelacija (IVIVC) matematički je model koji opisuje vezu između *in vitro* oslobađanja lijeka i *in vivo* odgovora (koncentracija lijeka u plazmi ili frakcija apsorbiranog lijeka). Dobro uspostavljen IVIVC može se rabiti kao alat za optimizaciju razvoja formulacije te za predikciju *in vivo* ponašanja lijeka primjenom samo laboratorijskih *in vitro* podataka o oslobađanju lijeka.

BCS klasifikacija lijeka daje informaciju je li moguće napraviti korelaciju za oralne ljekovite oblike s trenutačnim oslobađanjem. IVIVC je moguća kada lijek ima dobru permeabilnost te je oslobađanje lijeka limitirajući korak za njegovu apsorpciju (**tablica 5**) [1].

Tablica 5. Klasifikacija BCS i mogućnosti IVIVC-a [preuzeto i prilagođeno prema 1 uz dozvolu Springer Nature]

Klasa	**Mogućnost korelacije *in vitro – in vivo***
1.	limitirana, osim ako je proces oslobađanja sporiji od procesa pražnjenja želudca
2.	moguća ako je *in vitro* oslobađanje slično *in vivo* oslobađanju
3.	ograničena ili je nema
4.	ograničena ili je nema

Ako apsorpciju lijeka uvjetuje *in vivo* oslobađanje, što je tipično za klasu 2. lijekova te za formulacije s kontroliranim oslobađanjem, postoji velika vjerojatnost da će se razviti uspješan

IVIVC model, s tim da treba pronaći *in vitro* medij koji najbolje pokazuje razlike među formulacijama [1, 75].

2.4.1. Kategorije IVIVC-a

Prema američkim i europskim smjernicama, moguće je uspostaviti nekoliko kategorija korelacije: A, B i C [2, 3].

Kategorija A najviši je stupanj korelacije i označava funkcionalnu povezanost svih *in vitro* točaka krivulje oslobađanja i *in vivo* podataka.

Za kategoriju B upotrebljavaju se parametri utemeljeni na statističkoj analizi momenta, pa se npr. srednje vrijeme *in vivo* apsorpcije uspoređuje sa srednjim vremenom *in vitro* oslobađanja. Korelacije kategorije B ne smatraju se osobito korisnima jer različiti *in vitro* i *in vivo* profili mogu rezultirati jednakim srednjim vremenom.

Kategorija C uspostavlja korelaciju između oslobađanja *in vitro* u jednoj vremenskoj točki i jednoga farmakokinetičkog parametra; npr. 80 % otopljenog lijeka može se korelirati s vršnom koncentracijom lijeka u plazmi. Za višestruku kategoriju C nekoliko se farmakokinetičkih parametara povezuje s otopljenim lijekom u nekoliko vremenskih točaka [76].

2.4.2. Razvoj kategorije A IVIVC modela

Za uspješnu uspostavu IVIVC-a treba ispitati barem tri formulacije koje imaju različite brzine oslobađanja lijeka. *In vivo* ispitivanje provodi se na adekvatnom broju ljudi u ukriženoj studiji bez unosa hrane (uglavnom 12 – 36 ispitanika). Ako se lijek ne tolerira u uvjetima bez unosa hrane, studija se može provesti u uvjetima nakon unosa hrane. Prema smjernicama FDA-e, mogu se primijeniti *in vitro* vodeni mediji čiji pH ne prelazi 6,8 te je za slabo topljive djelatne tvari dopušteno dodati surfaktante [2].

Nakon provedene *in vivo* studije, izmjerene koncentracije lijeka u plazmi mogu se preračunati u *in vivo* apsorpcijski profil primjenom model-ovisnih metoda (Wagner-Nelsonove, Loo-Riegelmanove) i model neovisnih metoda (postupak dekonvolucije)[3, 77].

2.4.2.1. Model-ovisne metode

Dvije najčešće upotrebljavane metode za izračun *in vivo* apsorpcije lijeka jesu Wagner-Nelsonova i Loo-Riegelmanova metoda [77]. Obje su te model-ovisne metode utemeljene na balansu masa [78].

S obzirom na to da se u IVIVC modelu najčešće uspoređuje frakcija apsorbiranog lijeka s frakcijom *in vitro* oslobođenog lijeka, Wagner-Nelsonova jednadžba glasi:

$$F_A(t) = \frac{Ab}{Ab^{\infty}} = \frac{C_p V_d + kV_d[PIK]_0^t}{kV_d[PIK]_0^{\infty}} = \frac{C_p + k[PIK]_0^t}{k[PIK]_0^{\infty}} \quad (13)$$

Prema navedenoj formuli, frakcija *in vivo* apsorbiranog lijeka $F_A(t)$ može se izračunati uz pomoć $[PIK]_0^t$, parcijalne površine ispod koncentracijske krivulje, i $[PIK]_0^{\infty}$, površine ispod koncentracijske krivulje od vremena $t = 0$ do $t = \infty$, k konstante eliminacije i C_p koncentracije lijeka u plazmi u vremenu t [25].

Wagner-Nelsonova metoda primjenjuje se ako se lijek ponaša prema jednoprostornome modelu. Prednost te metode jest to što ne zahtijeva podatke *in vivo* nakon intravenske primjene lijeka ili primjene oralne otopine, međutim konstanta eliminacije mora se izračunati iz samoga eliminacijskog dijela krivulje, što se za lijekove s produljenom apsorpcijskom fazom i/ili dugim vremenom polueliminacije teško može odrediti [79, 80]. Nedostatak te metode jest primjenjivost samo za lijekove čija se farmakokinetika može opisati modelom jednog odjeljka.

Loo-Riegelmanova metoda primjenjuje se za lijekove čija se farmakokinetika opisuje modelom s dva ili više odjeljaka i zahtijeva podatke nakon intravenske primjene lijeka [25].

2.4.2.2. Model-neovisne metode

Konvolucija i dekonvolucija osnovni su alati potrebni za uspostavu kategorije A IVIVC-a. Metoda konvolucije jest model-neovisna metoda koja se primjenjuje u analizi linearnih sustava. Prema načelu superpozicije u linearnim vremenski invarijantnim sustavima, odgovor

sustava $C(t)$ na impulsni odziv $f(t)$ može se izračunati korištenjem konvolucije $f(t)$ i C_δ funkcije:

$$C(t) = f(t) * C_\delta = \int_0^t C_\delta\,(u) f(t-u)du \tag{14}$$

$C(t)$ predočuje koncentraciju lijeka u plazmi, a C_δ je jedinični impulsni odgovor (engl. *unit impulse response,* UIR) koji definira obilježja sustava. To je odgovor sustava, u ovom primjeru organizma, na trenutačni jedinični impuls koji se uglavnom postiže primjenom intravenskog bolusa ili oralne otopine. Pritom $f(t)$ označava proces *in vivo* apsorpcije ili *in vitro* oslobađanja, a u je varijabla integracije [76].

Prema istom načelu, $f(t)$ se može izračunati metodom dekonvolucije koja je inverzna operacija konvolucije.

U dekonvolucijskom se pristupu *in vivo* profil apsorpcije izračunava na temelju podataka o koncentraciji lijeka u plazmi ispitivane formulacije i koncentraciji lijeka nakon oralne ili intravenske primjene lijeka koji čine C_δ – jedinični impulsni odgovor. Jedinični impulsni odgovor intravenske formulacije sadržava informacije o distribuciji i eliminaciji te se dekonvolucijom podataka koncentracije ispitivane formulacije u plazmi dobije profil *in vivo* oslobađanja/apsorpcije. Jedinični impulsni odgovor oralne otopine sadržava informacije o apsorpciji, distribuciji i eliminaciji lijeka te se dekonvolucijom koncentracijskih podataka ispitivane formulacije dobije profil *in vivo* oslobađanja lijeka [81].

IVIVC model koji se koristi dekonvolucijskim pristupom naziva se još korelacijom u dva koraka.

U prvom se koraku izračunava apsorpcijski profil iz *in vivo* koncentracije lijeka u plazmi primjenom model-ovisnih ili model-neovisnih metoda.

U drugom se koraku uspostavlja matematička povezanost između *in vivo* i *in vitro* profila uz pomoć osnovnoga linearnog modela s odsječkom a i nagibom b:

$$postotak\ apsorbiranog\ lijeka_{in\ vivo} = a + b \times\ postotak\ otopljenog\ lijeka_{in\ vitro} \tag{15}$$

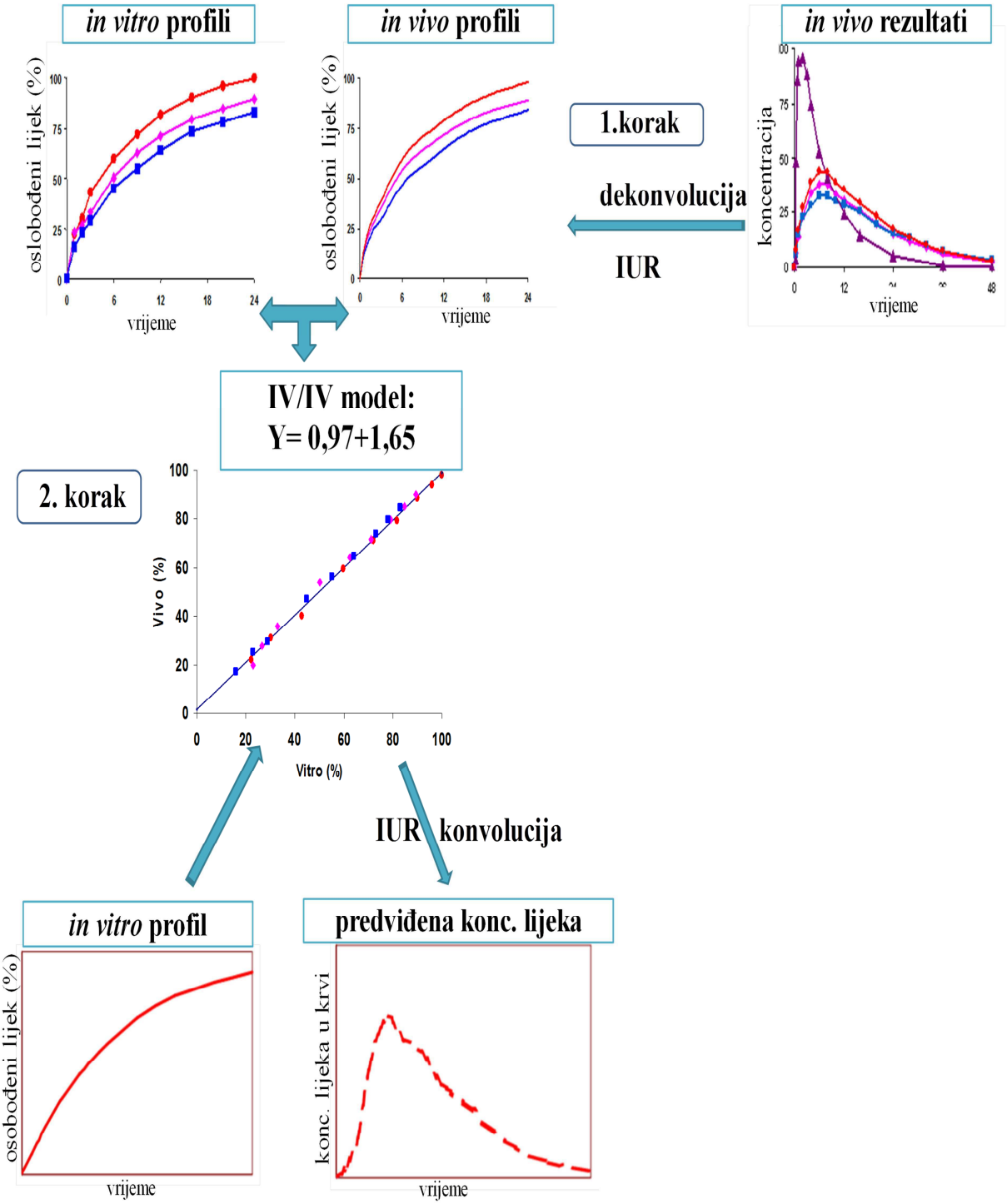
Nagib koji iznosi oko 1 označava korelaciju 1:1, a negativni odsječak pokazuje da je *in vivo* proces sporiji od *in vitro* procesa. Ako, pak, *in vitro* i *in vivo* profili imaju različite brzine ili su u početnom dijelu oslobađanja različiti (engl. *lag time*), može se primijeniti vremenski

faktor skaliranja da bi se postigla korelacija 1:1. Vremenski faktor skaliranja mora biti jednak za sve formulacije [82].

Katkad se može uspostaviti i nelinearna korelacija [76].

U sljedećem koraku primjenom razvijenoga IVIVC matematičkog modela novi se *in vitro* podatci oslobađanja preračunavaju u predviđene podatke *in vivo* apsorpcije lijeka. Predviđeni se rezultati apsorpcije lijeka *in vivo* konvolucijom s jediničnim impulsnim odgovorom (UIR) preračunavaju u predviđene koncentracije lijeka u krvi. **Slika 6** predočuje shematski prikaz uspostave IVIVC-a primjenom konvolucijskog integrala.

Dekonvolucijski pristup vrlo je koristan za analizu dobivenih podataka pri identifikaciji adekvatnog modela i za određivanje inicijalnih parametara za uspostavu IVIVC-a u jednom koraku [81]. Tijekom inicijalne obrade podataka koriste se grafički prikaz usporedbe postotka apsorbiranog lijeka i postotka *in vitro* oslobođenog lijeka u vremenu i Levyjev graf (usporedba vremena potrebnoga za apsorpciju određenog postotka *in vivo* doze s vremenom potrebnim za oslobađanje tog postotka *in vitro* doze) [81].



Slika 6. Prikaz uspostave IVIVC-a primjenom dekonvolucijskoj/konvolucijskog integrala

IVIVC se najčešće uspostavlja u dva koraka, međutim može se uspostaviti i u jednom koraku. Konvolucijski pristup izravno povezuje izmjerenu koncentraciju lijeka *in vivo* i *in vitro* podataka korištenjem nelinearnog modela s miješanim efektima koji je prvi put spomenut u radu O'Hare i suradnika [83], a zatim je dodatno razrađen u nekoliko radova [84, 85, 86, 87].

Uspostava IVIVC modela korištenjem nelinearnog modela s miješanim efektima omogućuje neposredno modeliranje *in vitro* i *in vivo* podataka u jednom koraku uzimanjem u obzir procjene različitih slučajnih činitelja kao što su varijabilnost među pojedinim tabletama, varijabilnost u *in vitro* rezultatima pojedinačnih tableta ili varijabilnost *in vivo* rezultata u pojedinog ispitanika. Primjena tako sofisticirane metode kao što je nelinearna metoda s miješanim efektima zahtijeva specijalizirani program kao što je NONMEM [88].

Osim konvolucijskog pristupa nelinearnog modela s miješanim efektima, IVIVC model od jednog koraka može biti utemeljen na metodi primjene fiziološko-farmakokinetičkih modela i metodi baziranoj na diferencijalnim jednadžbama [3].

Prostorni modeli za predviđanje apsorpcije (engl. *compartmental absorption and transit* - CAT) lijekova pripadaju matematičkim modelima koji s velikom točnošću mogu opisati prolazak i apsorpciju lijeka kroz različite segmente gastrointestinalnog trakta [38]. CAT model definiran je nizom diferencijalnih jednadžbi koje opisuju apsorpciju lijeka u različitim dijelovima gastrointestinalnog trakta, pri čemu se konstanta brzine apsorpcije za svaki prostor određuje na osnovi vrijednosti koeficijenta permeabilnosti za taj prostor. U CAT modelu tanko je crijevo podijeljeno na sedam dijelova s jednakim vremenima prolaska lijeka, pri čemu se model temelji na pretpostavkama da se lijek apsorbira samo pasivnom difuzijom, da su konstante brzine prolaska lijeka u svih sedam segmenata tankog crijeva jednake te da je apsorpcija lijeka u želudcu i kolonu zanemariva [38]. Unaprijeđeni prostorni model resorpcije i prolaska (engl. *advanced compartmental absorption and transit model* - ACAT) nadogradnja je s činiteljima koji nisu razmatrani u osnovnoj verziji CAT modela (to su brzina otapanja, pH-ovisna topljivost, apsorpcija u želudcu ili kolonu, metabolizam u crijevima, prijenos uz pomoć nosača, farmakokinetika, razlike u pojedinim dijelovima gastrointestinalnog trakta). Komercijalna verzija ACAT modela integrirana u GastroPlus program zahtijeva niz ulaznih podataka koji čine fizikalno-kemijske, formulacijske (doza, oblik, *in vitro* oslobađanje), fiziološke i farmakokinetičke parametre za predviđanje apsorpcije [89]. S obzirom na to da se CAT/ACAT modelima može predviđati koncentracijska krivulja uz pomoć *in vitro* podataka, oni se primjenjuju kao alternativna metoda za uspostavu IVIVC-a [90].

Buchwald je u svom radu detaljno opisao metodu utemeljenu na diferencijalnim jednadžbama koja izravno povezuje brzinu *in vitro* oslobađanja lijeka i farmakokinetički prostorni model koji opisuje izmjerene koncentracijske krivulje u određenom vremenu [91]. Farmakokinetički prostorni model opisuje se diferencijalnom jednadžbom koja sadržava funkcionalnu ovisnost

između brzine *in vivo* oslobađanja/apsorpcije i brzine *in vitro* oslobađanja lijeka. Funkcionalna povezanost može obuhvaćati vremenski pomak u apsorpciji (engl. *lag time*), različite vremenske skale *in vitro* i *in vivo* procesa te varijabilnost u apsorpciji tijekom prolaska lijeka kroz gastrointestinalni trakt. Metoda je slična konvolucijskom pristupu i temelji se na jednom koraku, međutim umjesto rješavanja integrala prikazanoga u jednadžbi (14), primjenjuju se diferencijalne jednadžbe koje opisuju farmakokinetički model ispitivanog lijeka. Premda je taj IVIVC pristup s farmakokinetičkog stajališta vrlo transparentan i jednoznačan i može zamijeniti složene setove diferencijalnih jednadžbi potrebnih za opisivanje prostornih modela apsorpcije i tranzita lijekova (CAT i ACAT) [91], pretraživanjem literature pronađen je samo jedan primjer IVIVC modela koji se koristi tim pristupom utemeljenim na izravnom rješavanju odgovarajućih diferencijalnih jednadžbi [92].

2.4.3. Interna i eksterna predikcija kategorije A IVIVC modela

Nakon uspostave IVIVC-a potrebno je provesti njegovu validaciju. IVIVC model prihvatljiv je ako dobro predviđa ciljane farmakokinetičke parametre i ako se pogreška predikcije nalazi unutar prihvatljivih granica.

Pogreške predikcija za farmakokinetičke parametre, površinu ispod krivulje (PIK) i vršnu koncentraciju (cmax) lijeka, izračunava se iz jednadžbe [76]:

$$\%\,PE = \left[\frac{(izmjerena\ vrijednost - predviđena\ vrijednost)}{izmjerena\ vrijednost}\right] \times 100 \tag{16}$$

Kategorija A IVIVC modela dobro je uspostavljena ako pogreška predikcije za svaku formulaciju uključenu u model ne prelazi 15 %, a ukupna apsolutna srednja vrijednost pogreške predikcije ne prelazi 10 %. Validacija modela može se provesti upotrebom internih podataka koji su korišteni za uspostavu IVIVC modela ili uz pomoć eksternih podataka koji se nisu rabili za razvoj modela. Predikcija korištenjem eksternih podataka ima uže granice za postotak pogreške predikcije (10 %) i preporučuje se pri uspostavi korelacije za lijekove koji imaju usku terapijsku širinu [2, 3].

2.4.4. Primjena IVIVC modela

IVIVC se primjenjuje tijekom razvoja formulacije jer omogućuje identifikaciju ciljane formulacije, odabir klinički relevantne *in vitro* metode kojom će se najbolje predviđati oslobađanje lijeka u *in vivo* uvjetima, čime se smanjuje broj potrebnih ispitivanja na ljudima tijekom razvoja formulacije [18, 20].

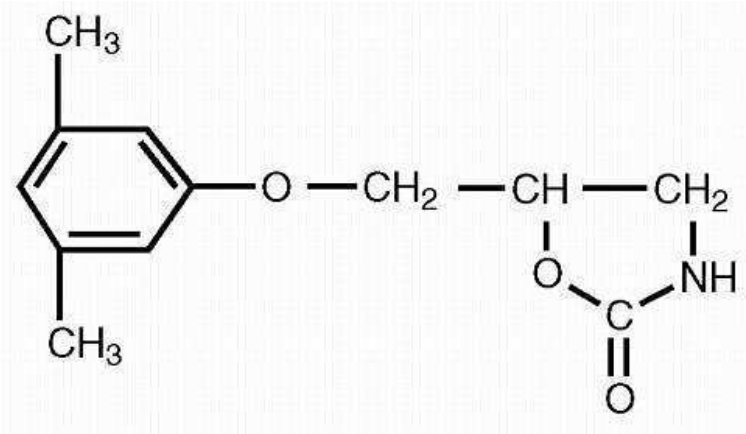
Uspostavljena korelacija primjenjiva je samo za određeni oblik formulacija (npr. za tablete, želatinske kapsule itd.) sa specifičnim mehanizmom oslobađanja (npr. s osmotskim sustavom) i specifičnim glavnim pomoćnim tvarima. Korelacija je točna i prediktivna samo ako su promjene formulacije unutar određenih granica te je mehanizam oslobađanja i pomoćne tvari koje su u njemu uključene jednak [76].

Regulatorne smjernice i većina primjera u literaturi fokusira se na uspostavu IVIVC modela za formulacije s kontroliranim oslobađanjem jer je za one s trenutačnim oslobađanjem taj zadatak dosta zahtjevan s obzirom na to da su te formulacije dizajnirane tako da trenutačno oslobađaju djelatnu tvar koja će imati klinički učinak u organizmu [93, 94, 95, 96]. No taj se koncept može proširiti i na formulacije s trenutačnim oslobađanjem, koje prema biofarmaceutskoj klasifikaciji pripadaju klasi 2. [1, 22, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103].

2.5. Opća svojstva metaksalona

Metaksalon (trgovački naziv: Skelaxin®, proizvođač King Pharmaceuticals Research and Development, Inc.) je odobren u Sjedinjenim Američkim Državama još od 1962. i na tržištu se pojavljuje u obliku ovalnih tableta s trenutačnim oslobađanjem jačine 800 mg.

Metaksalon je bijeli do gotovo bijeli kristalni prah bez mirisa, topljiv u kloroformu, metanolu i 96-postotnom etanolu, ali praktički je netopljiv u eteru ili vodi. Kemijski naziv metaksalona je 5-[(3,5-dimetilfenoksi)metil]-2-oksazolidinon [104]. Njegova je relativna molekularna masa 221,25, a kemijska mu je formula $C_{12}H_{15}NO_3$ (**slika 7**).



Slika 7. Kemijska struktura metaksalona

Metaksalon se uzima za opuštanje mišića te za olakšavanje akutnih bolnih stanja mišićno-koštanog sustava. Točan mehanizam djelovanja metaksalona u ljudi nije u potpunosti definiran i smatra se da postiže zbog sedativnog djelovanja na središnji živčani sustav. Metaksalon nema izravno djelovanje na kontraktilni mehanizam poprečno-prugastih mišića, motornu ploču ni živčano vlakno. Pripada skupini umjereno jakih mišićnih relaksansa s relativno malim nuspojavama. Na tržištu su postojale tablete i od 400 mg, koje su u međuvremenu povučene pa su danas na tržištu samo tablete od 800 mg [104].

2.5.1. Farmakokinetička svojstva metaksalona

Farmakokinetika metaksalona ispitivana je na zdravim dobrovoljcima nakon jednokratnog uzimanja lijeka uz jelo i na prazan želudac u dozama od 400 i 800 mg.

Vršna koncentracija pojavljuje se oko tri sata nakon uzimanja doze od 400 mg bez prisutnosti hrane, a vrijeme polueliminacije je 9,0 ± 4,8 sati. Udvostručivanje doze na 800 mg uzrokuje proporcionalno povećanje vršne koncentracije (cmax) i površine ispod krivulje (PIK). Apsolutna bioraspoloživost metaksalona nije ispitivana. Uzimanje lijeka uz hranu s velikim udjelom masti znatno povećava cmax i PIK u usporedbi s uzimanjem metaksalona na prazan želudac. Kad se lijek uzima uz jelo, vrijeme do postizanja vršne koncentracije produljuje se, a vrijeme polueliminacije se smanjuje. Prema uputi o lijeku, povećanje bioraspoloživosti

metaksalona i smanjivanje vremena polueliminacije može se pripisati potpunijoj apsorpciji metaksalona u prisutnosti hrane s visokim udjelom masti [104].

Vezivanje na proteine plazme nije ispitivano, ali uzimajući u obzir veliki volumen distribucije (~ 800 l) te lipofilnost metaksalona (logP = 2,42), pretpostavlja se da se metaksalon opsežno distribuira u tkiva. Metabolizira se u jetri, a metaboliti se izlučuju putem urina. Citokrom P450 u jetri najvažniji je za metabolizam metaksalona, ponajprije CYP1A2, CYP2D6, CYP2E1 i CYP3A4 te, u manjoj mjeri, CYP2C8, CYP2C9 i CYP2C19 [104].

2.5.2. Fizikalno-kemijska i biofarmaceutska svojstva metaksalona

Prema dostupnim literaturnim podatcima, topljivost metaksalona iznosi oko 0,36 mg/ml (0,34 – 0,38 mg/ml), stoga je klasificiran kao slabo topljiva djelatna tvar. Također, metaksalon nije pokazao pH-uvjetovanu topljivost, što je potkrijepilo tvrdnju da molekula nema ionizirajućih skupina [105]. Pretpostavlja se da bi metaksalon zbog slabe topljivosti te njegove lipofilnosti (log P = 2,42) mogao pripadati BCS klasi 2. lijekova. Međutim, ispitivanje permeabilnosti metaksalona nije provedeno i stoga se metaksalon ne može sa sigurnošću klasificirati prema BCS klasifikaciji [106].

USP monografija za metaksalon tablete propisuje provođenje *in vitro* pokusa oslobađanja u aparaturi s lopaticama pri 100 okr./min upotrebom 900 ml medija koji čini voda s dodatkom surfaktanta, 0,5 % natrijeva laurilsulfata [107].

U literaturnim se podatcima navodi da krivulje *in vitro* oslobađanja različitih formulacija metaksalona, testiranih u aparaturi s lopaticama (1000 ml vode uz dodatak 2 % natrijeva laurilsulfata pri brzini od 75 okr./min i 500 ml vode, uz dodatak 0,25 % natrijeva laurilsulfata pri 25 okr./min), ne mogu predvidjeti *in vivo* bioraspoloživost metaksalona te da u nedostatku validirane *in vitro – in vivo* korelacije dvije formulacije metaksalona koje imaju identične krivulje *in vitro* oslobađanja u navedenim medijima ne upućuju na *in vivo* bioekvivalenciju [108].

Nadalje, u literaturi se još mogu pronaći podatci da oslobađanje lijeka iz referentnih formulacija metaksalona ovisi o pH. Pri nižim pH vrijednostima (pH = 1,5) i uz dodatak 2 % natrijeva laurilsulfata, oslobađanje lijeka iz referentne formulacije je nisko i iznosi manje od

10 %. *In vitro* profili oslobađanja znatno se povećavaju upotrebom medija više pH vrijednosti (pH = 3, pH = 4,5 i pH = 6,8). Dobiveni su rezultati pokusa provedenih korištenjem aparature 2 i aparature 3 bili konzistentni [109].

Ako se potvrdi da metaksalon prema BCS-u pripada klasi 2. lijekova, može biti dobar kandidat za uspostavu *in vitro – in vivo* korelacije.

3. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Opći je cilj ovog rada klasifikacija BCS metaksalona i razvoj odgovarajuće *in vitro* metode za ispitivanje njegova oslobađanja iz tableta koja će najbolje predviđati apsorpciju lijeka nakon oralne primjene. Identifikacijom klinički relevantne *in vitro* metode olakšat će se razvoj generičke formulacije metaksalona i spriječiti nepotrebna ispitivanja na zdravim dobrovoljcima.

Specifični ciljevi rada jesu:

- određivanje topljivosti metaksalona prema BCS smjernicama
- određivanje permeabilnosti metaksalona i načina prijenosa metaksalona kroz sluznicu gastrointestinalnog trakta primjenom modela Caco-2 stanica
- ispitivanje utjecaja različitih vrsta veziva (hidroksipropilmetil celuloze 6 cp i povidona K30) na rezultate topljivosti, permeabilnosti, *in vitro* oslobađanja i *in vivo* bioraspoloživosti metaksalona
- razvoj i odabir odgovarajuće metode *in vitro* oslobađanja metaksalona: procjena utjecaja pH vrijednosti medija i količine dodanog surfaktanta na oslobađanje iz ispitivanih formulacija
- određivanje profila *in vivo* oslobađanja lijeka iz formulacija metaksalona ispitivanih u bioekvivalencijskoj studiji korištenjem model-ovisnih i model-neovisnih metoda
- uspostavljanje najvišeg stupnja korelacije, tj. kategorije A, koja odražava funkcionalnu povezanost svih točaka krivulje *in vitro* oslobađanja i krivulje *in vivo* apsorpcije
- validacija uspostavljene *in vitro – in vivo* korelacije određivanjem pogreške predikcije modela.

4. MATERIJALI I METODE

4. 1. Materijali

Za ispitivanje topljivosti i permeabilnosti korišteni su metaksalon u obliku mikroniziranog praška (proizvođač Angelini ACRAF SpA,), standard metaksalona (Angelini ACRAF SpA, sadržaj 99,95 %), etanol apsolutni (Kemika, p.a), hidroksipropilmetil celuloza 6cp (J. Rettenmaier & Söhne GmbH) i povidon K30 (Ashland). Za mobilnu fazu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) upotrijebljeni su metanol (Merck), acetonitril (Merck) kromatografskog stupnja čistoće i trifluoroctena kiselina (Merck, sadržaj 99,0 %). Caco-2 su nabavljene od proizvođača American Type Culture Collection (ATCC), a Transwell® sustavi od Corning Life Science. Kao standardi u ispitivanju permeabilnosti upotrijebljeni su propanolol hidroklorid (Sigma), rodamin 123 (Sigma) i fluorescein natrij (Fluka Chemica).

4.1.1. Uzorci formulacija

Za ispitivanje brzine oslobađanja i permeabilnosti metaksalona iz tableta *in vitro* uzete su dvije razvojne formulacije metaksalona i referentna formulacija Skelaxina®. Te su formulacije, uz svježe pripremljenu oralnu otopinu, primijenjene u *in vivo* pokusu na zdravim ispitanicima. **Tablica 6** sadržava podatke o ispitivanim formulacijama, a **tablica 7** donosi pregled sastavnica ispitivanih formulacija.

Tablica 6. Ispitivane formulacije

Tip formulacije	**Razvojna formulacija**	**Razvojna formulacija**	**Referentna formulacija**	**Oralna otopina**
oznaka	A	B	Skelaxin®	C
broj serije	18021006	18071006	ES804274A	MS0306 + R0306 (prašak + otapalo)
oblik	tableta s trenutačnim oslobađanjem	tableta s trenutačnim oslobađanjem	tableta s trenutačnim oslobađanjem	otopina
doza	800 mg	800 mg	800 mg	400 mg / 50 ml

Tablica 7. Kvalitativni sastav formulacija metaksalona

	Sastavnica tableta		A	B	Skelaxin®
1.	metaksalon	djelatna tvar	✔	✔	✔
2.	boja (Fd &C Yellow No. 6)	boja	✔	✔	/
3.	boja (B-rose liquid)	boja	/	/	✔
4.	mikrokristalinična celuloza tipa PH 101	punilo	✔	✔	/
5.	hidroksipropilmetil celuloza 6 cp	vezivo	✔	/	/
6.	alginska kiselina	vezivo	/	/	✔
7.	amonijev alginat	sredstvo za raspadanje	/	/	✔
8.	kalcijev alginat	sredstvo za raspadanje	/	/	✔
9.	povidon K30	vezivo	/	✔	/
10.	kukuruzni škrob	punilo	/	/	✔
11.	mikrokristalinična celuloza tipa PH 102	punilo	✔	✔	/
12.	natrijev škroboglikolat	sredstvo za raspadanje	✔	✔	/
13.	magnezijev stearat	klizno sredstvo	✔	✔	✔
	ukupno (mg)		**895**	**885**	**928**

Sastavnica oralne otopine metaksalona	**Količina**
metaksalon – djelatna tvar	400 mg
otapalo za pripremu „ex tempore“ metaksalon otopine	55,8 g
glicerol	✔
propilenglikol	✔
polietilenglikol 400	✔
etanol 96-postotni	✔
voda za injekcije	✔

Razvojne formulacije A i B imaju isti kvalitativni i kvantitativni sastav, samo se razlikuju po tome što razvojna formulacija A sadržava hidroksipropilmetil celulozu 6cp (HPMC) kao vezivo, a u formulaciji B vezivo je povidon K30 (PVP). Usto, vrlo je mala razlika u količini natrijeva škroboglikolata (15,5 mg u formulaciji A prema 14,5 mg u formulaciji B), koji se dodaje kao sredstvo za raspadanje. Veličina čestica (d_{90}) djelatne tvari metaksalona za izradu obiju formulacija iznosila je manje od 30 mikrona, tako da je veličina čestica kao kritični atribut kvalitete koji ima potencijalni učinak na *in vivo* apsorpciju razvojnih formulacija metaksalona isključena. Za obje razvojne formulacije metaksalona primijenjen je tehnološki proizvodni proces vlažne granulacije. Procesni su parametri za obje formulacije bili slični, osim što je za formulaciju A zbog drukčije vrste veziva u pripremi otopine veziva dodana veća količina vode, a pri komprimiranju tableta primijenjena je malo veća sila (15,8 prema 12,3 kN).

Za formulaciju referentnog lijeka Skelaxina® poznat je samo kvalitativni sastav. Umjesto HPMC-a i PVP-a kao vezivo je korištena alginska kiselina te amonijev i kalcijev alginat.

4.1.2. Mediji za ispitivanje topljivosti, permeabilnosti i *in vitro* oslobađanja

Za pripremu medija korišteni su: natrijev laurilsulfat (NaLS, Merck, Ph EUR ≥ 85,0 %), koncentrirana kloridna kiselina (HCl, Kemika, min 36,5 %), natrijev klorid (NaCl, Kemika), natrijev acetat trihidrat ($CH_3COONa \times 3H_2O$, Kemika), octena kiselina (CH_3COOH, Merck, 100 % glacijalna), kalijev dihidrogen fosfat (KH_2PO_4, Kemika), natrijev dihidrogen fosfat dihidrat ($NaH_2PO_4 \times 2\ H_2O$, Kemika), natrijev hidroksid (NaOH, Kemika), etanol (Kemika), demineralizirana voda.

Sve su tvari bile odgovarajućeg stupnja čistoće (p.a).

Sastav medija koji su poslužili za ispitivanje topljivosti i *in vitro* oslobađanja prikazan je u **tablici 8.**

Tablica 8. Sastav *in vitro* medija upotrijebljenih za ispitivanje topljivosti i *in vitro* oslobađanja

Broj	Medij	Sastav medija u 10 l vodenog medija (demineralizirana voda)
1.	0,1 M HCl	85 ml koncentrirane HCl
2.	USP acetatni pufer pH 4,5	29,9 g $CH_3COONa \times 3\ H_2O$, 19 ml koncentrirane CH_3COOH
3.	USP fosfatni pufer pH 6,8	68,05 g KH_2PO_4, 8,96 g NaOH
4.	USP fosfatni pufer pH 7,4	68,05 g KH_2PO_4, 15,6 g NaOH
5.	USP medij voda + 0,5 % NaLS	50 g NaLS
6.	USP acetatni pufer pH 4,5 + 0,5 % NaCl + 0,1 % NaLS	29,9 g $CH_3COONa \times 3\ H_2O$, 19 ml koncentrirane CH_3COOH, 50 mg NaCl, 10 g NaLS
7.	USP acetatni pufer pH 4,5 + 0,5 % NaCl + 0,2 % NaLS	29,9 g $CH_3COONa \times 3\ H_2O$, 19 ml koncentrirane CH_3COOH, 50 mg NaCl, 20 g NaLS
8.	USP acetatni pufer pH 4,5 + 0,5 % NaCl + 0,3 % NaLS	29,9 g $CH_3COONa \times 3\ H_2O$, 19 ml koncentrirane CH_3COOH, 50 mg NaCl, 30 g NaLS
9.	USP acetatni pufer pH 4,5 + 0,4 % NaLS + 0,5 % NaCl	29,9 g $CH_3COONa \times 3\ H_2O$, 19 ml koncentrirane CH_3COOH, 50 mg NaCl, 40 g NaLS
10.	fosfatni pufer pH 6,8 + 0,5 % NaCl + 0,1 % NaLS	78,00 g $NaH_2PO_4 \times 2\ H_2O$, 9,2 g NaOH, 50 mg NaCl, 10 g NaLS
11.	fosfatni pufer pH 6,8 + 0,5 % NaCl + 0,2 % NaLS	78,00 g $NaH_2PO_4 \times 2\ H_2O$, 9,2 g NaOH, 50 mg NaCl, 20 g NaLS
12.	fosfatni pufer pH 6,8 + 0,5 % NaCl + 0,3 % NaLS	78,00 g $NaH_2PO_4 \times 2\ H_2O$, 9,2 g NaOH, 50 mg NaCl, 30 g NaLS
13.	fosfatni pufer pH 6,8 + 0,5 % NaCl + 0,4 % NaLS	78,00 g $NaH_2PO_4 \times 2\ H_2O$, 9,2 g NaOH, 50 mg NaCl, 40 g NaLS

Priprema acetatnog pufera pH 4,5 s 0,5 % NaCl i 0,1 %, 0,2 %, 0,3 % ili 0,4 % NaLS. Izvaže se natrijev acetat trihidrat, natrijev klorid, doda koncentrirana octena kiselina i dopuni demineraliziranom vodom. Korigiranje pH postiže se koncentriranom octenom kiselinom ili otopinom 0,1 M NaOH. Natrijev laurilsulfat se doda u jedan dio pripremljenoga acetatnog pufera s 0,5 % natrijeva klorida, zagrije da se otopi i pomiješa s ostatkom pripremljenog pufera.

Priprema fosfatnog pufera pH 6,8 s 0,5 % NaCl i 0,1, 0,2, 0,3 % ili 0,4 % NaLS. Izvaže se natrijev dihidrogen fosfat dihidrat, NaOH, natrijev klorid i dopuni demineraliziranom vodom. Vrijednost pH korigira se koncentriranom octenom kiselinom ili otopinom 0,1M NaOH. Natrijev laurilsulfat se doda u jedan dio pripremljenoga fosfatnog pufera pH 6,8 s 0,5 % natrijeva klorida, zagrije se da se otopi i pomiješa s ostatkom pripremljenog fosfatnog pufera.

Za uzgoj Caco-2 stanica i određivanje permeabilnosti na Caco-2 modelu upotrijebljeni su: Dulbeco's Modified Eagle's medij (engl. *Dulbeco's Modified Eagle's medium*-DMEM), koji sadržava glukozu, natrijev hidroksikarbonat ($NaHCO_3$), piridoksin i fenolno crvenilo, bez L-Glutamina (Gibco Invitrogen Corp.), fetalni goveđi serum (FBS) koji nije inaktiviran (Gibco Invitrogen Corp), otopina s neesencijalnim aminokiselinama (engl. *nonessential amino acids* – NEAA) 100X, (Gibco Invitrogen Corp.), Glutamaks I (engl. *Glutamax I*) (Gibco Invitrogen Corp.), penicilin (10000 U/ml)/streptomicin (10000 μg/ml) (Gibco Invitrogen Corp.), dimetil sulfoksid (DMSO, Sigma), PBS tablete (engl. *Phosphate buffered saline*, Sigma), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA, Sigma), HBSS otopina (engl. *Hank's balanced salt solution*) bez fenolnog crvenila (Sigma), N-(2-hidroksietil)piperazin-N'-(2-etansulfonska kiselina) (HEPES, Sigma), 1 M NaOH (Kemika) i 1 M HCl (Kemika).

Kompletni medij za uzgoj stanica DMEM-10. Sastoji se od DMEM-a, toplinski inaktiviranog FBS-a (5%), NEEA-e, Glutamaksa I i penicilina/streptomicina. Hranjivi se medij čuva u hladnjaku (od + 2 do + 8 °C), u zatvorenoj boci, i koristi se do promjene pH, odnosno do promjene boje u ljubičastu.

Hranjivi medij za zamrzavanje stanica. Kompletan se medij priprema miješanjem DMEM-10 i 5 % DMSO-a.

Otopina za ispiranje stanica PBS-EDTA pH 7,4. Priprema se tako da se napravi otopina PBS-a i doda EDTA-e te se prema potrebi korigira pH uz pomoć 1M NaOH. Priređena se otopina sterilizira autoklaviranjem ili se u kabinetu za aseptični rad filtrira kroz sterilni filtar za jednokratnu upotrebu s porama 0,2 μm (TPP, Nalgene).

Transportni medij HBSS-12 mM HEPES. Priprema se tako da se HEPES pomiješa s otopinom HBSS-a i otopi uz lagano miješanje. Vrijednost pH namjesti se na željenu razinu (od pH 6,0 do pH 7,4) dodatkom 1M NaOH ili 1M HCl.

4.2. Metode

4.2.1. Ispitivanje topljivosti

Ispitivanje topljivosti čiste djelatne tvari metaksalona, binarne smjese metaksalona i hidroksipropilmetil celuloze 6 cp (*m*/*m* omjer 20:1) i binarne smjese metaksalona i povidona 30K (*m*/*m* omjer 20:1) provedeno je u ovim medijima: demineraliziranoj vodi, 0,1M HCl, USP acetatnom puferu pH 4,5 i USP fosfatnom puferu 6,8 te u USP fosfatnom puferu čiji je pH 7,4. Binarne smjese metaksalona i pomoćnih tvari pripremljene su u omjeru kakav je u formulacijama tableta. Ispitivanje je provedeno tri puta metodom prezasićene otopine. Otapanje metaksalona te smjese metaksalona i pomoćne tvari ispitano je tako što je prašak u suvišku (oko 100 mg) dodan u staklene cilindre s 20 ml odgovarajućeg medija. Dobivena je suspenzija miješana na termostatiranoj orbitalnoj tresilici (GFL inkubator tresilica), zaštićeno od svjetlosti, brzinom od 100 okr./min, na temperaturi od 37 ºC tijekom 24 sata. Na kraju pokusa u staklenim je cilindrima ostalo neotopljenog praška te je supernatant profiltriran kroz filtar (VK 35 μm), a koncentracija otopljenog metaksalona određena je UV-Vis spektrofotometrom (Cary 100).

Za potrebe UV-Vis spektrofotometrije linearnost razrijeđenih radnih standarda ispitivana je u području od 0,09 do 0,8 mg/ml pri 271 nm upotrebom kivete od 1 cm. Rezultati izmjerene apsorbancije standarda iskorišteni su za izradu kalibracijskog pravca. Regresijskom analizom dobivenih rezultata određen je regresijski koeficijent, nagib i odsječak na osi y. Regresijska analiza i grafički prikaz pokazali su linearnost standarda, a koeficijent korelacije bio je veći od 99 %. Mjerenje pH provedeno je nakon pokusa upotrebom pH-metra (Radiometer PHM

240). Stabilnost otopine metaksalona u korištenim medijima ispitana je na temperaturi 37 ºC tijekom 24 sata i rezultati su potvrdili stabilnost otopine u tim uvjetima.

4.2.2. Ispitivanje *in vitro* oslobađanja metaksalona iz tableta

Mjerenje brzine oslobađanja metaksalona iz ispitivanih formulacija provedeno je u automatskoj aparaturi tipa 2 s rotirajućom lopaticom (VK/Varian 7010) spojenim s UV-Vis spektrofotometrom (Cary 50/100), na temperaturi 37,0 ± 0,5 °C. Volumen medija bio je 900 ml, brzina okretanja 50 okr./min i 100 okr./min za USP metodu [107]. Korišteni *in vitro* mediji navedeni su u **tablici 8** (broj 5 – 13) te je ispitivan utjecaj pH medija i količine dodanog surfaktanta natrijeva laurilsulfata (NaLS). U odgovarajućim vremenskim intervalima (nakon 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14 i 15 sati ili 0, 15, 30, 45, 60, 75 i 90 minuta za USP metodu) uzorkovano je 5 ml medija. Uzorci su automatski filtrirani kroz filtre (VK 35 μm), a koncentracija otopljenog metaksalona mjerena je prethodno opisanom UV-Vis spektrofotometrijskom metodom primijenjenom za određivanje topljivosti metaksalona. Nakon automatiziranog protoka otopine kroz mjerni instrument – spektrofotometar, iste su otopine vraćene u posude, uz zadržavanje konstantnog volumena medija u posudama s uzorkom.

4.2.3. Određivanje permeabilnosti primjenom modela stanica Caco-2

Stanice se uzgajaju u strogo kontroliranim sterilnim uvjetima prema proceduri koju je propisao proizvođač (ATCC). Vijal sa stanicama odmrzava se u vodenoj kupelji (37 °C), najduže 10 minuta te se sadržaj sterilnom pipetom prenosi u sterilnu kivetu (50 ml) s oko 40 ml medija DMEM-10 i centrifugira 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Pipetom se pažljivo odstrani supernatant, doda 10 ml svježeg medija, promiješa i prenese u sterilnu tikvicu za uzgoj stanica od 25 cm^2. Stanice Caco-2 inkubiraju se u CO_2 inkubatoru (Sanyo) na 37 °C s 5 % CO_2 pri relativnoj vlažnosti od 90 %. Rabi se sterilni stanični medij prethodno zagrijan na 37 °C i svi se postupci provode u aseptičnim uvjetima. Za uzgoj stanica Caco-2 upotrebljava se kompletni medij DMEM-10. Stanice Caco-2 pasažiraju se kada postignu konfluentnost od 70 do 85 %, i to upotrebom enzima tripsina koji uzrokuje odvajanje stanica od podloge te

stanica međusobno. Prije inkubacije tripsinom stanice se ispiru otopinom EDTA-e u PBS-u radi uklanjanja preostalog medija. Rast stanica redovito se provjerava vizualno i pod mikroskopom: prate se boja, bistrina i nepostojanje mikroorganizama u mediju te gustoća (konfluentnost) stanica i njihov izgled. Medij se mijenja prvi dan nakon pasažiranja te zatim drugi ili treći dan, sve dok stanice ne postignu pokrivenost površine tikvice – konfluentnost od 70 do 85 %. Stanice konfluentnije od 85 % ne koriste se. Stanice se pasažiraju te se dobivena suspenzija razrjeđuje medijem DMEM-10 do određene koncentracije stanica (**tablica 9**).

Tablica 9. Određivanje koncentracije stanica za nasađivanje na filtre Transwell ovisno o dimenzijama i zadanoj gustoći

Promjer filtra (mm)	**Gustoća stanica (broj stanica/cm^2)**	**Koncentracija stanica (broj stanica /ml)**	**Volumen na gornjoj strani filtra (ml)**
12	40 000	$0{,}088 \times 10^6$	0,5
12	60 000	$0{,}132 \times 10^6$	0,5
12	80 000	$0{,}176 \times 10^6$	0,5
12	100 000	$0{,}220 \times 10^6$	0,5
24	40 000	$0{,}125 \times 10^6$	1,5
24	60 000	$0{,}188 \times 10^6$	1,5
24	80 000	$0{,}250 \times 10^6$	1,5
24	100 000	$0{,}313 \times 10^6$	1,5

Za potrebe ispitivanja permeabilnosti metaksalona korištene su Caco-2 stanice pasaža 45-47. Na Transwell® ploče (Corning cat. No. 3402, promjera 12 mm i veličine pore 3 μm), koje su prethodno inkubirane hranjivim medijem, nasađuju se Caco-2 stanice u gustoći 60 000 stanica po cm^2, koja se pokazala optimalnom za diferenciranje i formiranje monosloja. Na apikalnu stranu svakog filtra nanese se 0,5 ml stanične suspenzije.

Stanice se diferenciraju i formiraju monosloj unutar 18 do 28 dana od dana nasađivanja, što se provjerava mikroskopski. Pri promjeni medija prate se boja i izgled medija, prisutnost mikroorganizama, propusnost filtara za tekućinu te rast stanica na filtru i njihovo eventualno postojanje na donjem dijelu filtra. Boja medija mora biti narančastocrvena do crvena. Filtri se

ne upotrebljavaju za daljnji uzgoj ni za pokuse permeabilnosti ako se boja medija promijeni u žutu ili ružičastu i/ili ako se medij zamuti.

Kvaliteta staničnog monosloja potvrđena je mjerenjem transepitelnoga električnog otpora (TEER, Millicel®-ERS, Millipore) prije i nakon pokusa te dodatno potvrđena uz pomoć invertnog mikroskopa (Olympus CKX41). Za dodatnu provjeru integriteta staničnog monosloja nakon pokusa s testiranim uzorcima metaksalona na tim je istim stanicama ispitivana permeabilnost niskopermeabilnog standarda fluorescein natrija.

Postojanje efluks transportera utvrđeno je mjerenjem P_{app} rodamina u smjeru AB/BA.

Sve su otopine pripremljene u transportnome mediju HBSS-12 mM HEPES pH vrijednosti 7,4. Propanolol je pripremljen u koncentraciji 100 μg/ml s 1 % DMSO-a. Rodamin je pripremljen u koncentraciji 1,9 μg/ml s 1 % DMSO-a. Koncentracija fluoresceina natrija bila je 10 μg/ml. Različite koncentracije metaksalona, djelatne tvari i iz uzoraka tableta koje su prethodno smrvljene, otopljene su uz pomoć 1 % DMSO-a te je dobivena suspenzija profiltrirana. Nominalna koncentracija djelatne tvari bila je 300 μg/ml, a za tablete je iznosila 300 μg/ml i 100 μg/ml. Kako bi se ispitao eventualni utjecaj pomoćnih tvari na permeabilnost metaksalona, pripremljene su binarne smjese metaksalona s HPMC-om ili PVP-om i razrijeđene do konačne koncentracije od 300 μg/ml.

U svim eksperimentima na apikalnoj i bazolateralnoj strani upotrijebljen je isti transportni medij HBSS-12 mM HEPES pH vrijednosti 7,4. Volumen na apikalnoj strani iznosio je 0,5 ml, a na bazolateralnoj 1,5 ml. Prije početka ispitivanja stanice Caco-2 isprane su transportnim medijem i inkubirane 30 minuta, nakon čega je izmjeren TEER. Ispitivanje prijenosa metaksalona u AB smjeru provedeno je dodavanjem otopine s testiranim uzorcima ili standarda u apikalni odjeljak (donor) u vremenu 0 i uzimanjem uzoraka iz bazolateralnog odjeljka (receptor) u određenim vremenskim točkama. Ispitivanje prijenosa u BA smjeru provedeno je dodavanjem otopina u bazolateralni odjeljak (donor) i skupljanjem uzoraka u apikalnom odjeljku (receptor). Nakon uzimanja uzoraka iz oba odjeljka jednaki je volumen nadomješten zagrijanim transportnim medijem.

Točke uzorkovanja bile su ove:

- iz donorskog odjeljka 20 μl u vremenu 0 i 60 ili 120 minuta
- iz receptorskog odjeljka 200 μl uzorka u vremenu 0, 20, 40 i 60 minuta ili 0, 40, 80 i 120 minuta.

Ploče sa staničnim monoslojem inkubirane su na 37 °C u uvjetima okoliša, uz orbitalno miješanje (GFL Orbital Shaker) pri 50 okr./min. Sve su otopine tijekom pokusa bile zagrijane na 37 °C.

Provedena su ukupno četiri pokusa uz identične eksperimentalne uvjete (**tablica 10):**

- dva pokusa s metaksalonom i binarnim smjesama metaksalona i HPMC-a ili PVP-a
- dva pokusa s tabletama metaksalona (A, B, Skelaxin®).

Tablica 10. Ispitivanje permeabilnosti metaksalona korištenjem Caco-2 modela: uzorci i eksperimenti

Broj eksperimenta	**Testirani uzorci (koncentracija)**		
1. AB smjer 2 sata	metaksalon (260 μg/ml)	metaksalon i PVP (omjer 1:1)	metaksalon i HPMC (omjer 1:1)
2. AB smjer 2 sata	metaksalon (300 μg/ml)	metaksalon i PVP (omjer 1:1)	metaksalon i HPMC (omjer 1:1)
3. AB i BA smjer 2 sata	A (300 μg/ml)	B (300 μg/ml)	Skelaxin® (300 μg/ml)
4. AB smjer 1 sat	A (100 μg/ml)	B (100 μg/ml)	Skelaxin® (100 μg/ml)

Eksperimenti su provedeni četiri ili tri puta (smjer AB) odnosno dva puta (smjer BA).

Fluorescein natrij i rodamin analizirani su mjerenjem fluorescencije pri valnoj duljini eksitacije od 485 nm i emisije od 530 nm (Victor^2, Wallac).

Sadržaja metaksalona i propanolola određen je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC). U **tablici 11** navedena su uvjeti analize uzoraka HPLC metodom.

Neki su uzorci odmah analizirani, dok su ostali pohranjeni u hladnjaku na –20 °C. Prije analize uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi, kratko centrifugirani i preneseni u mikrobočice (engl. *micro vials*).

Tablica 11. Uvjeti analize uzoraka HPLC metodom

	Metaksalon	**Propanolol**
mobilna faza	metanol i ultračista voda s 0,1-postotnom trilfuoroctenom kiselinom u omjeru 55:45 (v/v)	ultračista voda s 0,1-postotnom trilfuoroctenom kiselinom (A) i acetonitrila s 0,1-postotnom trilfuoroctenom kiselinom (B)
kolona	XTerra MS C18 (50 x 2,1 mm, veličina čestica 5,0 μm, proizvođač: Waters) s predfiltrom	XTerra MS C18 (50 x 2,1 mm, veličina čestica 3,5 μm, proizvođač: Waters) s predfiltrom
temperatura kolone	40 °C	30 °C
brzina protoka mobilne faze	450 μl/min	300 μl/min
volumen injektiranja	20 μl	10 μl
valna duljina	273 nm	290 nm
vrijeme analize (engl. *run time*)	10 min	10 min

Za ultračistu vodu upotrijebljen je sustav Ultra Clear UV Plus water system (SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation). Mobilna je faza propuštena kroz filtar 0,2 μm.
U HPLC metodi za propanolol korišten je gradijent naveden u **tablici 12.**

Tablica 12. Korišteni gradijent za HPLC metodu propanolola

Vrijeme (min)	**0**	**4**	**5**	**6,1**	**10**
B (%)	0	50	50	0	0

Analize su provedene uz pomoć uređaja Agilent 1100/1200 Series (Agilent Technologies), opremljenih detektorom s nizom dioda (DAD).

Za potrebe HPLC analiza pripremljene su otopine standarda u koncentraciji unutar linearnog područja metode. Otopine standarda pripremljene su u duplikatu i injektirane naizmjenično kroz sekvenciju s uzorcima. U svakoj su sekvenciji s uzorcima otopine standarda injektirane najmanje pet puta.

Prikladnost sustava provjerena je prema zahtjevu da relativno standardno odstupanje (RSD) odgovora detektora za sva injektiranja otopina standarda unutar sekvencije ne smije biti veće od 2,0 % te da faktor razvlačenja pika metaksalona i propanolola ne smije biti veći od 2,0.

Permeabilnost je izračunana prema jednadžbi (4) [14]:

$$P_{app} = (dQ/dt)/(A \times C_0) \quad (17)$$

Iskorištenje mase (engl. *mass recovery*) dobiveno je iz jednadžbe:

$$iskorištenje\ mase \quad = (m_{r120} + m_{d120})/(m_{r0} - m_{d0}) \quad (18)$$

u kojoj je m_{r120} – masa u odjeljku receptora na kraju ispitivanja permeabilnosti, m_{d120} – masa u odjeljku donora na kraju ispitivanja, m_{r0}– masa u odjeljku receptora na početku ispitivanja, a m_{d0}– masa u odjeljku donora na početku ispitivanja.

4.2.4. *In vivo* ispitivanje

Bioekvivalencijsko ispitivanje odobrilo je etičko povjerenstvo, a provedeno je u ugovornoj istraživačkoj ustanovi SBFC Anapharm, u Kanadi, prema prihvaćenim internacionalnim standardima i zahtjevima lokalne regulative uključujući načela navedena u Helsinškoj deklaraciji i zahtjevima dobre kliničke prakse (GCP).

Cilj studije

Cilj studije bio je usporediti bioraspoloživost dviju razvojnih formulacija metaksalona s trenutačnim oslobađanjem 800 mg doze, referentne formulacije - Skelaxin® 800 mg te 400 mg / 50 ml oralne otopine metaksalona na zdravim dobrovoljcima u uvjetima bez unosa hrane.

Ispitivane formulacije

Broj serije ispitivanih formulacija naveden je u **tablici 6**. Oralna otopina pripremljena je 2-3 sata prije doziranja tako što je 50 ml (jedna bočica) otapala dodano u bočicu koja sadržava 400 mg suhog praška metaksalona te je bočica mućkana oko 5 minuta. Bočica je ostavljena u mirovanju do nestanka mjehurića (oko 15 minuta). Nakon toga mućkanje je ponovljeno i bočica je opet ostavljena u mirovanju do nestanka mjehurića (oko 15 minuta). Procedura mućkanja ponavljana je sve dok se prašak metaksalona nije potpuno otopio.

Dizajn

Doza lijeka se primjenjuje na prazan želudac te je pokus randomiziran i četiri puta ukrižen. Ispitanici su dobili sve četiri formulacije prema pripremljenoj randomizacijskoj listi (četiri perioda, četiri sekvencije). Razmak između primijenjenih doza u svakom je periodu iznosio sedam dana. Ispitanici i kliničko osoblje znali su koji je lijek primijenjen jer se smatra da to ne može utjecati na koncentraciju lijeka u krvi.

Broj ispitanika: 18

Ispitanici

U ispitivanje su uključeni zdravi muškarci, nepušači ili oni koji puše manje od devet cigareta u danu, u dobi od 18 do 45 godina, indeksa tjelesne mase veće ili jednake 19,0 i manje od 27,0 kg/m^2, minimalne težine 70 kg. Subjekti su trebali zadovoljiti sve uključne i isključne kriterije navedene u protokolu i sve uvjete utemeljene na medicinskoj i zdravstvenoj procjeni te na rezultatima mjerenja krvnog tlaka, temperature, pulsa, disanja, EKG-a, analize krvi i urina, alkohol-izdisajnog testa, testiranja na droge u urinu te testiranja na HIV i hepatitis. Prije odabira ispitanika svi su potencijalni kandidati informirani o ciljevima ispitivanja, procedurama, rizicima i ograničenjima na njima razumljivom jeziku. Sudjelovanje u ispitivanju bilo je isključivo dobrovoljno i potvrđeno je potpisivanjem informativnog pristanka.

Uzorkovanje

Uzeta su 22 uzorka krvi u svakom periodu: 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,33; 2,67; 3; 3,33; 3,67; 4; 4,5; 5; 6; 7; 8; 10; 12; 16; 24; 36 i 48 sati nakon uzimanja doze; krv je vađena putem intravenske kanile ili izravnom venepunkcijom, uz upotrebu epruveta od 3 ml koje su sadržavale antikoagulans dikalijevu sol etilendiaminotetraoctene kiseline (K_2EDTA). Uzorci krvi čuvani su u ledenoj kupelji i centrifugirani u rashladnoj centrifugi brzinom od 3000 okr./min u trajanju 10 minuta na temperaturi 4 °C. Nakon centrifugiranja uzorci plazme stavljeni su u zamrzivač na –80 °C i zatim prebačeni u zamrzivač na –20 °C ± 5 °C, gdje su pohranjeni do analize. Vrijeme utrošeno od vađenja krvi do početka centrifugiranja nije bilo dulje od 110 minuta, a vrijeme koje je proteklo od početka centrifugiranja do pohrane uzoraka plazme u zamrzivač nije bilo dulje od 192 minute. Ukupna količina krvi uzete tijekom studije nije prelazila 299 ml.

Bioanalitička metoda

Koncentracija metaksalona u uzorku plazme određena je upotrebom spregnutog sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i spektrometrije masa (HPLC-MS) te izokratnog eluiranja mobilnom fazom metanol/ 2 mM amonijev formijat (60:40) na koloni Zorbax SB-C18, 4,6 x 50 mm, 5µm. Analitička metoda validirana je u području 25,13 ng/ml do 2513 ng/ml, s korelacijskim faktorom $r \geq 0,9992$ i iskorištenjem većim od 73 % za tri koncentracijske razine i iskorištenjem većim od 76 % za interni standard. Validacijom metode dokazana je selektivnost određivanja metaksalona u uzorku plazme i uz prisutnost potencijalno prisutnih tvari u plazmi (paracetamola, kofeina, dekstrometorfana, difenhidramina, dimenhidrinata, heparina, ibuprofena, nikotina, pseudoefedrina i acetilsalicilne kiseline). Točnost metode dodatno je ispitana testom razrjeđivanja uzorka plazme (dva puta i dvadeset puta). Rezultati su pokazali da takvom pripremom uzorka nije došlo do gubitka analita. Analiza uzoraka plazme također je provedena u ugovornoj istraživačkoj ustanovi SBFC Anapharm, u Kanadi.

Standardizacija uvjeta

U svim periodima studije ispitanici su u ugovornu ustanovu koja provodi kliničko ispitivanje primljeni večer prije doziranja i 24 sata nakon doziranja pušteni su kući. Uzimanje hrane nije bilo dopušteno deset sati prije i četiri sata nakon doziranja. Standardizirani obroci i vrijeme obroka bilo je jednako za sva četiri perioda studije tijekom hospitalizacije ispitanika. Lijek se uzimao s 240 ml vode pod strogim nadzorom, uz detaljan pregled usne šupljine. Sat prije i

dva sata nakon uzimanja lijeka ispitanici nisu smjeli piti vodu, a nakon tog perioda mogli su je uzimati po želji. Prva četiri sata nakon primjene lijeka nije bilo dopušteno ležanje ni spavanje i trebalo se pridržavati protokolom propisanih ograničenja o hrani i piću koji sadržavaju ksantine, o energetskim pićima, alkoholu, grejpfrutu, OTC pripravcima i pušenju.

Izračun farmakokinetičkih parametara i statistička analiza rezultata

Izmjerene koncentracije metaksalona u uzorcima plazme upotrijebljene su za izračun sljedećih farmakokinetičkih parametara uz pomoć softvera WinNonLin, verzija 6.4 (Phoenix, Certara), i to neprostornom analizom podataka [110].

PIK_t – površina ispod koncentracijske krivulje (PIK) tijekom intervala uzorkovanja izračunana je prema trapeznoj formuli:

$$PIK_{(t_i - t_{i+1})} = \frac{1}{2} \times (c_i + c_{i+1}) \times (t_{i+1} - t_i) \tag{19}$$

gdje c_i i c_{i+1} označavaju dva uzastopna mjerenja koncentracije lijeka u plazmi, a t_i i t_{i+1} dva uzastopna vremena uzorkovanja. Pravilom trapezoida cijela se površina ispod krivulje podijeli na više manjih segmenata, a ukupna površina jednaka je zbroju površina svih trapezoida.

PIK_∞ – površina ispod koncentracijske krivulje (PIK) do beskonačnosti (∞) izračunana je prema formuli:

$$PIK_\infty = PIK_t + \frac{c_t}{k} \tag{20}$$

U njoj je PIK_t površina ispod koncentracijske krivulje od početka uzorkovanja do zadnje izmjerene koncentracije, c_t je zadnja izmjerenu koncentracija koja je iznad limita detekcije, a k je konstanta eliminacije dobivena regresijskom analizom logaritmiranih podataka koncentracije lijeka- $c(t)$ i to od vremenske točke kad započne eliminacijska faza do posljednje koncentracije koja je iznad granice kvantifikacije.

$cmax$ – najviša izmjerena koncentracija lijeka.

$tmax$ – vrijeme kada je izmjerena najviša koncentracija lijeka.

$PIK_{t/\infty}$ – omjer između PIK_t i PIK_∞.

$t_{1/2}$ – vrijeme polueliminacije ovisi o konstanti eliminacije k i izračunava se prema formuli:

$$t_{1/2} = ln2/k \tag{21}$$

Volumen distribucije (V_d) nakon primjene oralne otopine izračunava se prema formuli:

$$V_d = \frac{doza}{k \times PIK_\infty} \tag{22}$$

k je konstanta eliminacije, a PIK_∞ površina ispod koncentracijske krivulje do beskonačnosti.

S vremenskim devijacijama tijekom uzimanja uzorka postupalo se ovako:

- vremenska razlika između planiranoga i stvarnog uzorkovanja krvi manja od jedne minute smatrala se prihvatljivom
- ako je vremenska razlika bila veća od jedne minute, stvarno vrijeme uzorkovanja uzeto je za izračun farmakokinetičkih parametara.

Izmjerene koncentracije metaksalona u plazmi dodatno su analizirane primjenom jednoprostornog modela s procesom apsorpcije prvog reda [91] za izračun PIK_t i *cmax*, uz korištenje jednadžbe (12), opisane u odlomku 2.3.5.1, i uz pomoć programa Wolfram Mathematica 11.1. [111]:

$$c_p(t) = A(e^{-kt} - e^{-k_a t}) \tag{23}$$

U toj je jednadžbi $c_p(t)$ koncentracija lijeka u krvi u vremenu t, a parametri A (odsječak na logaritamskoj osi y), k (konstanta eliminacije) i k_a (konstanta apsorpcije) mogu se izračunati prilagođivanjem modela na dobivene koncentracijske krivulje (engl. *fitting procedure*).

Dobiveni su farmakokinetički parametri sumirani za svaku formulaciju. Analiza varijance (ANOVA) provedena je uz pomoć softvera WinNonLin, verzija 6.4 (Phoenix, Certara) [110] na ln-transformiranim PIK_t i $cmax$ te su sekvencija, ispitanik unutar sekvencije, period i formulacija uključeni u model kao faktori. Izračunan je omjer najmanjih kvadrata (engl. *least square means*) ln-transformiranih geometrijskih srednjih vrijednosti glavnih farmakokinetičkih parametara PIK_t i $cmax$ u slučaju primjene tableta u usporedbi s otopinom i Skelaxinom® te je određen 90-postotni interval pouzdanosti. Koeficijent varijabilnosti farmakokinetičkih parametara za svakoga pojedinog ispitanika koji upućuje na razlike u koncentraciji lijeka kada se isti lijek primijeni istim ispitanicima u jednakim eksperimentalnim uvjetima u različitim periodima studije (engl. *intra subject variability*) izračunan je prema jednadžbi:

$$VARIJABILNOST\ UNUTAR\ ISPITANIKA = 100 \times \sqrt{(e^{MSE} - 1)} \quad (24)$$

U njoj MSE predočuje srednju kvadratnu pogrešku.

4.2.5. Uspostava *in vitro – in vivo* korelacije

Prvi korak pri uspostavi *in vitro – in vivo* korelacije usporedba je profila *in vitro* oslobađanja lijeka i profila *in vivo* apsorpcije. Profil *in vivo* apsorpcije može se izračunati model-neovisnom metodom dekonvolucije ili model-ovisnom Wagner-Nelsonovom metodom.

4.2.5.1. Izračun profila *in vivo* apsorpcije dekonvolucijskom metodom

Za numeričku dekonvoluciju podataka metaksalona upotrijebljen je softver WinNonLin, verzija 6.4 (Phoenix, Certara) [110].

Dekonvolucijom konvolucijskog integrala upotrebom izmjerenih koncentracija lijeka u plazmi nakon primjene oralne otopine, koje su jedinični impulsni odgovor $c_\delta(t)$, i izmjerenih koncentracija lijeka u plazmi nakon primjene ispitivanih formulacija tableta metaksalona c(t) dobivene su vrijednosti odziva sustava *in vivo* f(t), što je *in vivo* frakcija apsorbiranog lijeka.

Za izračun odziva sustava *in vivo* f(t) softver Phoenix koristi se temeljnim načelima dekonvolucije putem konvolucije (engl. *deconvolution through convolution- DCT*). Srednje i individualne koncentracije metaksalona u plazmi nakon primjene oralne otopine metaksalona i normalizacije doze na jediničnu vrijednost, korištene su za izračun parametara jediničnoga impulsnog odgovora $c_\delta(t)$. Parametri (A i k) opisuju jedinični impulsni odgovor $c_\delta(t)$ i rabe se za dekonvoluciju podataka. Izmjerene srednje i individualne koncentracije metaksalona u plazmi nakon uzimanja tableta primijenjene su kao odgovor sustava c(t). Impulsni odziv sustava *in vivo* f(t), dobiven metodom dekonvolucije, odražava proces *in vivo* apsorpcije lijeka za sve tri formulacije tableta metaksalona. Osim postotka apsorbiranog lijeka, izračunata je i kumulativna količina apsorbiranog lijeka za svaku formulaciju.

4.2.5.2. Izračun profila *in vivo* apsorpcije Wagner-Nelsonovom metodom

Postotak frakcije apsorbiranog lijeka *in vivo* Wagner-Nelsonovom metodom izračunan je putem Microsoft Excela 2010. Izmjerene koncentracije lijeka u plazmi i farmakokinetički parametri PIK_t, PIK_∞ ispitivanih formulacija tableta i k oralne otopine upotrijebljeni su za izračun postotka frakcije lijeka *in vivo* apsorbiranoga uz pomoć jednadžbe (13), opisane u odlomku 2.4.2.1.:

$$F_a(t) = \frac{Ab}{Ab^\infty} = \frac{C_p V_d + kV_d[PIK]_0^t}{kV_d[PIK]_0^\infty} = \frac{C_p + k[PIK]_0^t}{k[PIK]_0^\infty} \tag{25}$$

4.2.5.3. Određivanje kategorije A IVIVC modela

Za uspostavu najvišeg stupnja korelacije, tj. kategorije A *in vivo – in vitro* korelacije korištena je izravna metoda utemeljena na diferencijalnim jednadžbama koju je predložio Buchwald [91]. Za oralno primijenjeni lijek koji prati jednoprostorni farmakokinetički model brzina promjene količine lijeka u tijelu jednaka je razlici brzine apsorpcije i brzine eliminacije te se može prikazati ovom diferencijalnom jednadžbom [91]:

$$dc_p/dt = r(t) - k \cdot C_p(t) \tag{26}$$

u kojoj je C_p koncentracija lijeka u plazmi u vremenu t, k konstanta eliminacije, a $r(t)$ brzina procesa *in vivo* oslobađanja/apsorpcije lijeka koja se funkcionalnom ovisnošću može povezati s brzinom *in vitro* oslobađanja primjenom jednadžbe [91]:

$$r(t) = s_r \cdot r_{dis}(b_0 + b_1 \cdot t) \tag{27}$$

U toj jednadžbi r_{dis} označava brzinu *in vitro* oslobađanja u vremenu t. Parametri b_0 i b_1 vremenski su faktori pomaka i skaliranja, a s_r je faktor skaliranja koji omogućuje skaliranje visine i apsorbira razlike u mjernim jedinicama.

Sigmoidalna padajuća funkcija (φ_{abs}), koja uzima u obzir varijabilnost apsorpcije lijeka tijekom prolaska kroz gastrointestinalni trakt i ima jedan parametar η, nije imala značajan učinak na dobivene rezultate. Stoga je, da bi se smanjio broj parametara u modelu, vrijednost sigmoidalne padajuće funkcije (φ_{abs}) u svakom vremenu t iznosila 1.

Modeliranje krivulja *in vitro* oslobađanja omogućuje rješenje sustava diferencijalnih jednadžbi (26) i (27). Jednostavna varijanta eksponencijalnog modela (engl. *a special case of a well-known mechanistic growth model*), opisana u poglavlju 2.1.3.4.2., upotrijebljena je za modeliranje podataka *in vitro* [35]:

$$f_{dis}(t) = a \cdot (1 - e^{-\lambda \cdot t}) \tag{28}$$

s tim da se a i λ parametri određuju prilagođivanjem modela na izmjerene krivulje *in vitro* oslobađanja. Brzina *in vitro* oslobađanja – $r_{diss}(t)$ iz jednadžbe (27), derivacija je f_{dis} funkcije navedene u jednadžbi (28), tj. $r_{dis}(t) = f'_{dis}(t)$.

U tom se slučaju spomenuti sustav diferencijalnih jednadžbi može izravno analitički riješiti uz pomoć softvera Wolfram Mathematica 11.1., a rješenje je [111]:

$$C(a, \lambda, s_r, b_0, b_1, k, t) = \frac{a \cdot \lambda \cdot s_r}{k - b_1 \cdot \lambda} \left(e^{-(b_0 + b_1)\lambda t} - e^{-(k + b_0 \lambda)t}\right) \tag{29}$$

Dobiveno rješenje jednadžbe (29) ima oblik jednoprostornog modela s apsorpcijom prvog reda prikazanom u jednadžbi (23), a ostali korišteni parametri već su objašnjeni u jednadžbama (27) i (28). Određivanja obaju parametara modeliranja *in vitro* krivulja iz jednadžbe (28) za sve tri testirane formulacije provedeno je pojedinačno primjenom Nelder-Meadova algoritma u procesu prilagođivanja. Dobiveni *in vitro* parametri za sve tri formulacije iskorištavaju se u sljedećem koraku, u kojemu se izračunava jedan set procijenjenih parametara (s_r, b_0, b_1 i k) za sve tri ispitivane formulacije.

Farmakokinetički parametri ($cmax$ i PIK) izračunani su uz pomoć softvera Wolfram Mathematica 11.1. [111].

Provedena je validacija predviđenih i izmjerenih rezultata uspostavljenoga IVIVC modela. Farmakokinetički parametri ($cmax$ i PIK) za izmjerene koncentracije lijeka izračunani su prema jednadžbi (23) i uspoređeni s predviđenim farmakokinetičkim parametrima dobivenim uz pomoć jednadžbe (29). Relativna pogreška predikcije za farmakokinetičke parametre, površinu ispod krivulje i vršnu koncentraciju za svaku pojedinu formulaciju određena je iz jednadžbe (16), opisane u odjeljku 2.4.3. [2, 3]:

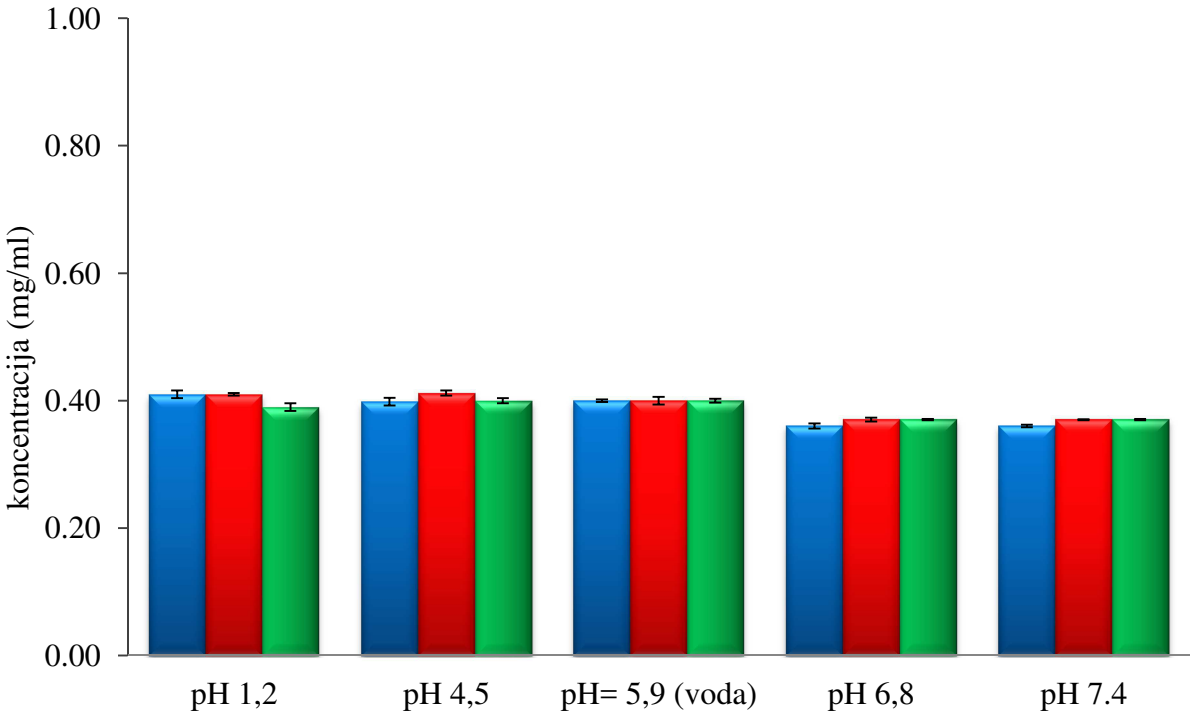
$$\%\, PE = \left[\frac{(izmjerena\ vrijednost - predviđena\ vrijednost)}{izmjerena\ vrijednost}\right] \times 100 \tag{30}$$

Također je izračunata i srednja apsolutna pogreška predikcije modela.

5. REZULTATI I RASPRAVA

5.1. Topljivost metaksalona

Topljivost metaksalona ispitivana je u ukupno pet medija: 0,1 M HCl; USP acetatnom puferu pH 4,5; USP fosfatnom puferu pH 6,8; USP fosfatnom puferu pH 7,4 i demineraliziranoj vodi. Osim topljivosti metaksalona, u istim je medijima ispitivana topljivost binarne smjese metaksalona i HPMC-a te metaksalona i PVP-a. S obzirom na to da metaksalon nema ionizirajućih funkcionalnih skupina, odabrani su mediji adekvatni za određivanje topljivosti metaksalona u relevantnom pH području prema važećim smjernicama FDA-e i EMA-e [4, 5]. Prosječna topljivost metaksalona iznosila je 0,39 mg/ml, najniža vrijednost topljivosti bila je 0,36 mg/ml u fosfatnom puferu pH 6,8 i 7,4, a najviša 0,41 mg/ml u 0,1 M HCl-u. Rezultati ispitivanja topljivosti (**slika 8**) pokazali su da nema značajnog utjecaja pH na topljivost metaksalona u fiziološkom pH području od 1,2 do 7,4 i u skladu su s dostupnim literaturnim podatcima [105]. Mjerenja pH vrijednosti nakon provedenih eksperimenata pokazala su da nije došlo do promjene pH medija. Izračun doznog broja i omjera doze/topljivosti potvrđuje da je metaksalon slabo topljiva djelatna tvar jer se doza lijeka (800 mg) ne može otopiti u 250 ml medija (**tablica 13).** Rezultati ispitivanja topljivosti binarne smjese metaksalona i HPMC-a (omjer 20:1) i smjese metaksalona i PVP-a (omjer 20:1) pokazali su da je prosječna vrijednost topljivosti metaksalona s dodatkom pomoćnih tvari jednaka topljivosti čiste djelatne tvari i iznosila je 0,37 – 0,41 mg/ml, što potvrđuje da dodatak pomoćnih tvari (HPMC-a i PVP-a) nema utjecaja na topljivost metaksalona.



Slika 8. pH profil topljivosti metaksalona ( ), binarne smjese metaksalona i HPMC-a ( ) i metaksalona i PVP-a ( ). Prikazane su srednje vrijednosti ± SD.

Tablica 13. Rezultati omjera doze/topljivosti i doznog broja u različitim medijima

pH	Doza/topljivost(ml)			Dozni broj		
	metaksalon	metaksalon i HPMC	metaksalon i PVP	metaksalon	metaksalon i HPMC	metaksalon i PVP
pH 1,2	1951	1951	2051	7,80	7,80	8,21
pH 4,5	2007	1942	2000	8,03	7,77	8,00
pH = 5,9 (voda)	2000	2000	2000	8,00	8,00	8,00
pH 6,8	2222	2162	2162	8,89	8,65	8,65
pH 7,4	2222	2162	2162	8,89	8,65	8,65

5.2. Rezultati permeabilnosti na stanicama Caco-2

Ispitivanje permeabilnosti primjenom Caco-2 modela provedeno je na uzorku djelatne tvari metaksalona, binarnoj smjesi metaksalona i HPMC-a, binarnoj smjesi metaksalona i PVP-a te razvojnim formulacijama tableta (A, B) i s referentnim lijekom Skelaxinom®. Zbog slabe topljivosti metaksalona, ispitivanja permeabilnosti provedena su pri nominalnoj koncentraciji metaksalona od 300 μg/ml i 100 μg/ml.

Mikroskopski je provjeren integritet Caco-2 staničnog monosloja koji je potvrdio postojanje neprekinutog monosloja. Mjerenjem TEER-a prije i nakon prijenosa metaksalona te nakon prijenosa fluoresceina i rodamina dobivena je TEER vrijednost koja služi kao kriterij za potvrdu integriteta monosloja (**tablica 14**). Koncentracija DMSO-a u svim je uzorcima pokusa 1. prelazila koncentraciju od 2 %. To je rezultiralo TEER vrijednošću nižom od 50 %, pa su dobiveni rezultati pokusa 1. odbačeni.

Tablica 14. TEER staničnog monosloja Caco-2

Broj pokusa	**TEER (Ω*cm^2) srednja vrijednost ± SD**			**TEER (%)**	
	netretirane stanice	nakon prijenosa metaksalona	nakon prijenosa standarda		
1.	492 ± 17	280 ± 15	220 ± 15	57	45
2.	487 ± 82	419 ± 67	284 ± 55	86	58
3.	584 ± 56	555 ± 41	337 ± 50	95	58
4.	677 ± 15	643 ± 92	512 ± 14	95	76

5.2.1. Permeabilnost standarda

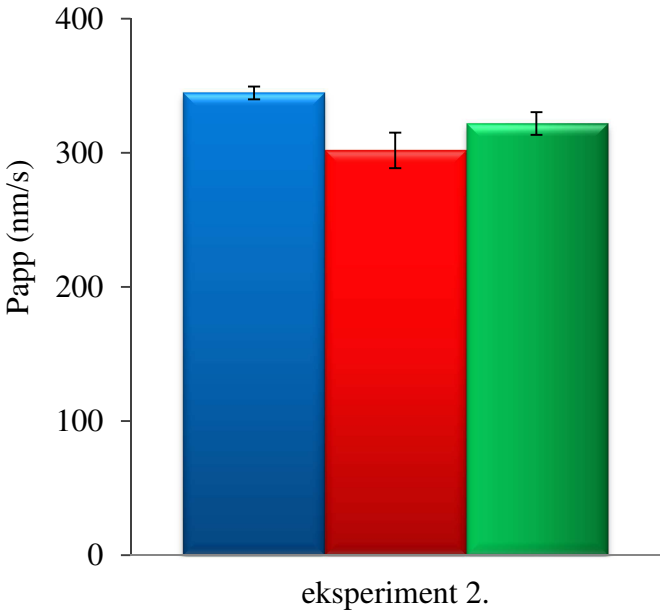
Permeabilnost visokopermeabilnog standarda – propanolola, određivana je tijekom svih pokusa, osim pokusa 1., koji je odbačen jer nije dao zadovoljavajuću TEER vrijednost. Srednja vrijednost koeficijenta permeabilnosti visokopermeabilnog standarda propanolola bila je u rasponu 199,4 – 258,9 nm/s i ponavljala se u provedenim eksperimentima. Niskopermeabilni standard fluorescein natrij ispitivan je u svim pokusima osim u pokusu 3., u kojemu je korišten rodamin u oba smjera (BA i AB) za potvrdu aktivnosti P-glikoproteina. Vrijednost P_{app} za niskopermeabilni standard fluorescein natrij i rodamin u smjeru AB bila je niska i iznosila je manje od 5 nm/s. Vrijednost P_{app} rodamina u smjeru BA iznosila je oko 78,5 nm/s (**tablica 15**). Izračunani omjer BA/AB dobivene P_{app} vrijednosti za efluks standard rodamin od 17 potvrđuje aktivnost P-glikoproteina na stanicama (BA/AB omjer veći od 3 upućuje na aktivan efluks prijenos). Prema literaturnim podatcima i prethodnim rezultatima provedenim na Caco-2 modelu, dobivene P_{app} vrijednosti potvrdile su da su stanice formirale kontinuirani monosloj s ekspresijom efluksnih transportera (P-gp).

Tablica 15. Permeabilnost standarda

Standardi	**Smjer prijenosa**	**P*app* (nm/s) srednja vrijednost ± SD**		
		pokus 2.	pokus 3.	pokus 4.
propanolol	AB	199,4 ± 21,0	245,7 ± 3,5	258,9 ± 34,1
rodamin	BA	nije mjeren	78,5 ± 12,2	nije mjeren
rodamin	AB	nije mjeren	4,6 ± 1,3	nije mjeren
fluorescein	AB	3,7 ± 1,9	nije mjeren	2,2 ± 0,3

5.2.2. Permeabilnost metaksalona

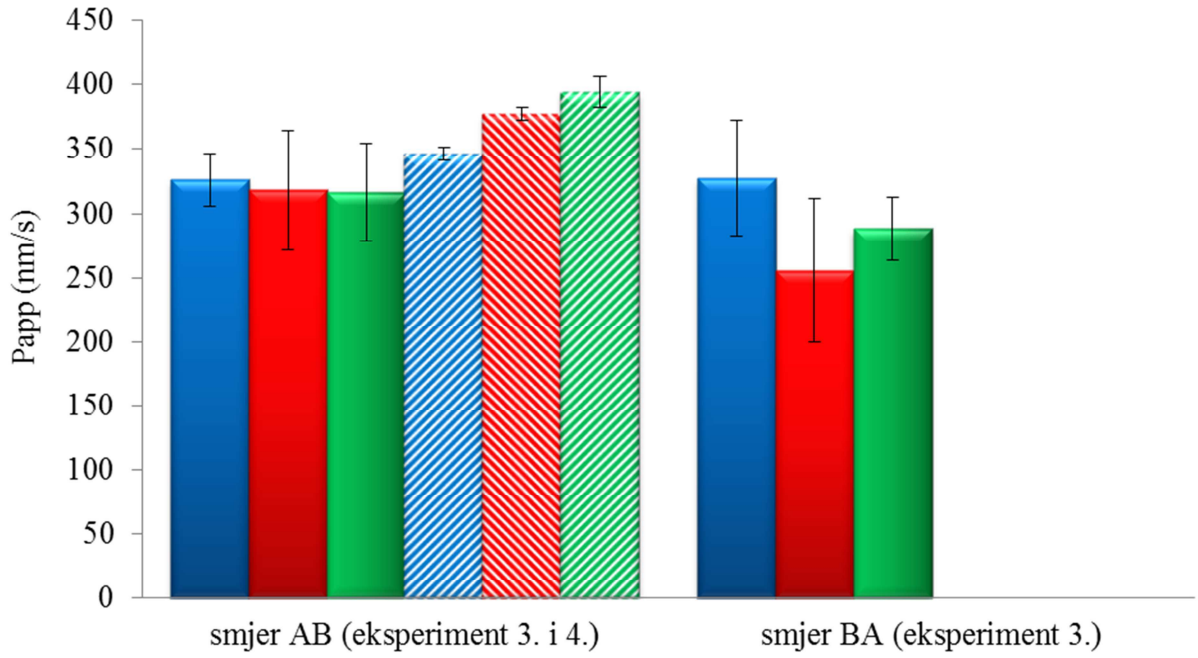
Provedena su dva pokusa ispitivanja P_{app} na Caco-2 modelu djelatne tvari metaksalona, binarne smjese metaksalona i HPMC-a i binarne smjese metaksalona i PVP-a (**slika 9**). Dobivene vrijednosti P_{app} za metaksalon u pokusu 1. bile su više zbog koncentracije DMSO-a, koja je bila viša od 2 % i utjecala je na integritet staničnog monosloja; stoga ti rezultati nisu prikazani.



Slika 9. Koeficijent permeabilnost (P_{app}) metaksalona ( ), binarne smjesa metaksalona i HPMC-a ( ) te metaksalona i PVP-a ( ) drugom eksperimentu. Prikazane su srednje vrijednosti ± SD.

Da bi se odredio P_{app} razvojnih formulacija (A i B) i Skelaxin® tableta, provedena su dva neovisna pokusa (3. i 4.). Prvi je proveden u smjeru AB i u smjeru BA. Inicijalna koncentracija metaksalona u svim ispitivanim uzorcima bila je 300 µg/ml. U četvrtom je pokusu mjeren samo prijenos u smjeru AB. Zbog visoke permeabilnosti metaksalona, vrijeme uzorkovanja smanjeno je na jedan sat, a koncentracija metaksalona smanjena je na 100 µg/ml (**slika 10**).

Promijenjeni eksperimentalni uvjeti nisu značajno utjecali na dobivene P_{app} vrijednosti analiziranih uzoraka.



Slika 10. Koeficijent permeabilnost metaksalona (P_{app}) u formulaciji A ( ), formulaciji B ( ) i Skelaxinu® ( ). Koncentracija u eksperimentu 3. bila je 300 µg/ml, a u eksperimentu 4. smanjena je na 100 µg/ml (rezultati mjerenja dobiveni u eksperimentu 4. prikazani su s bijelim prugicama). Prikazane su srednje vrijednosti ± SD

Iskorištenje mase izračunano iz uzoraka na početku pokusa i nakon njegove provedbe te inicijalnih koncentracija prikazano je u **tablici 16**. U svim pokusima iskorištenje mase bilo je veće od 90 %.

Tablica 16. Iskorištenje mase metaksalona

Broj pokusa	Početno iskorištenje mase (%) ± SD	Iskorištenje mase prijenosa (%) ± SD
2.	91,7 ± 5,0	95,8 ± 3,6
3.	103,0 ± 4,3	102,9 ± 4,1
4.	89,2 ± 3,9	90,7 ± 4,4

Eksperimentalno je na *in vitro* Caco-2 modelu dobivena P_{app} vrijednost djelatne tvari metaksalona viša od 250 nm/s. Izračunani P_{app} usporediv je s P_{app} vrijednošću

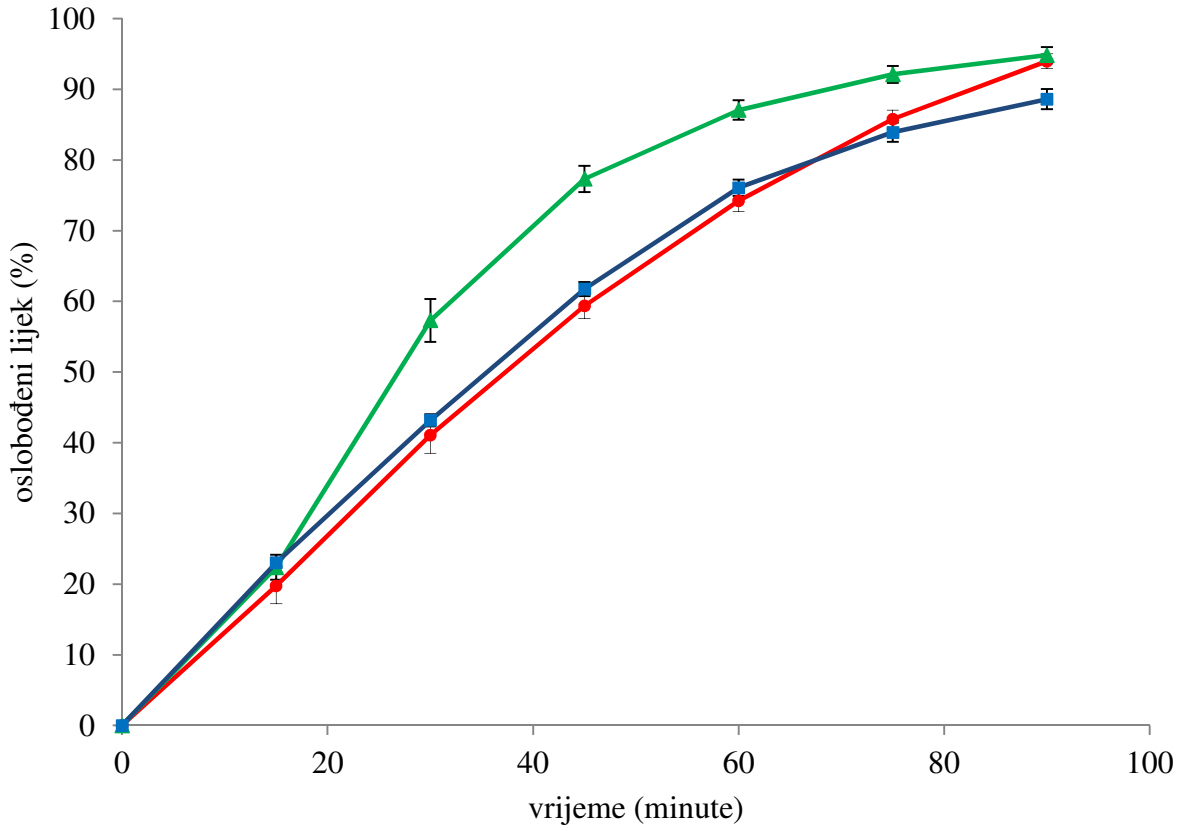
visokopermeabilnog standarda propanolola (>199 nm/s). Prema dobivenim rezultatima, metaksalon se može svrstati u visokopermeabilne lijekove. Eksperimentalno izračunate P_{app} vrijednosti djelatne tvari metaksalona, binarnih smjesa metaksalona i HPMC-a te metaksalona i PVP-a međusobno su vrlo slične, iz čega se može zaključiti da ispitivane pomoćne tvari ne utječu na permeabilnost metaksalona, što je u skladu s očekivanjima za visokopermeabilne djelatne tvari.

Metaksalon u svim ispitivanim formulacijama tableta ima visok P_{app} (> 300 nm/s). Nema značajne razlike u vrijednostima P_{app} razvojnih formulacija i referentnog lijeka Skelaxina®, što sugerira da će sve formulacije u gastrointestinalnom traktu imati jednaku permeabilnost. P_{app} metaksalona u tabletama nije se znatnije promijenio smanjenjem početno odabrane koncentracije (s 300 na 100 μg/ml), što upućuje na pasivan prijenos. Može se očekivati da bi pri aktivnom prijenosu s povećanjem koncentracije došlo do zasićenja transportera te do smanjenja vrijednosti P_{app}. U pokusima na Caco-2 modelu dobivene su usporedive vrijednosti P_{app} u smjeru AB i BA, što znači da metaksalon nije supstrat za P-gp. Usporedive P_{app} vrijednosti metaksalona i propanolola (standard za transcelularnu pasivnu difuziju) i lipofilnost metaksalona (logP = 2,42) pokazuju da se metaksalon najvjerojatnije apsorbira pasivnim transcelularnim putem.

Na temelju dobivenih rezultata topljivosti i permeabilnosti, metaksalon se prema biofarmaceutskoj klasifikaciji lijekova može svrstati u klasu 2.: slabo je topljiva i dobro permeabilna djelatna tvar te je dobar kandidat za uspostavu *in vitro – in vivo* korelacije. U skladu s očekivanjima za visokopermeabilne djelatne tvari, dodatak HPMC-a, PVP-a i ostalih pomoćnih tvari nije utjecao na dobivene rezultate permeabilnosti metaksalona.

5.3. *In vitro o*slobađanje metaksalona

Ispitivanje *in vitro* oslobađanja metaksalona, dviju razvojnih formulacija (A i B) i referentne formulacije Skelaxina®, najprije je provedeno prema USP preporučenoj metodi [107]: 900 ml vode uz dodatak 0,5 % NaLS-a u aparaturi tipa 2 uz 100 okr./min. Uzorkovanje je provedeno u vremenskim točkama 0, 15, 30, 45, 60, 75 i 90 minuta, a rezultati su prikazani na **slici 11.**



Slika 11. Profili oslobađanja metaksalona iz formulacije A (●), formulacije B (▲) i Skelaxina® (■) prema USP metodi (900 ml vode uz dodatak 0,5 % NaLS) pri brzini lopatica od 100 okr./min. Prikazane su srednje vrijednosti ± SD (n = 12) [preuzeto i prilagođeno prema 112 uz dozvolu Springer Nature].

Profili oslobađanja prema preporučenoj USP metodi pokazivali su da Skelaxin® i razvojna formulacija A imaju slične profile, a da je oslobađanje razvojne formulacije B brže od oslobađanja ostalih formulacija. USP metoda omogućuje relativno brzo oslobađanje metaksalona (80 % lijeka oslobodi se unutar 1,5 sati) i najvjerojatnije je odabrana kao QC metoda proizvedenog lijeka tijekom rutinske proizvodnje različitih serija referentnog proizvoda.

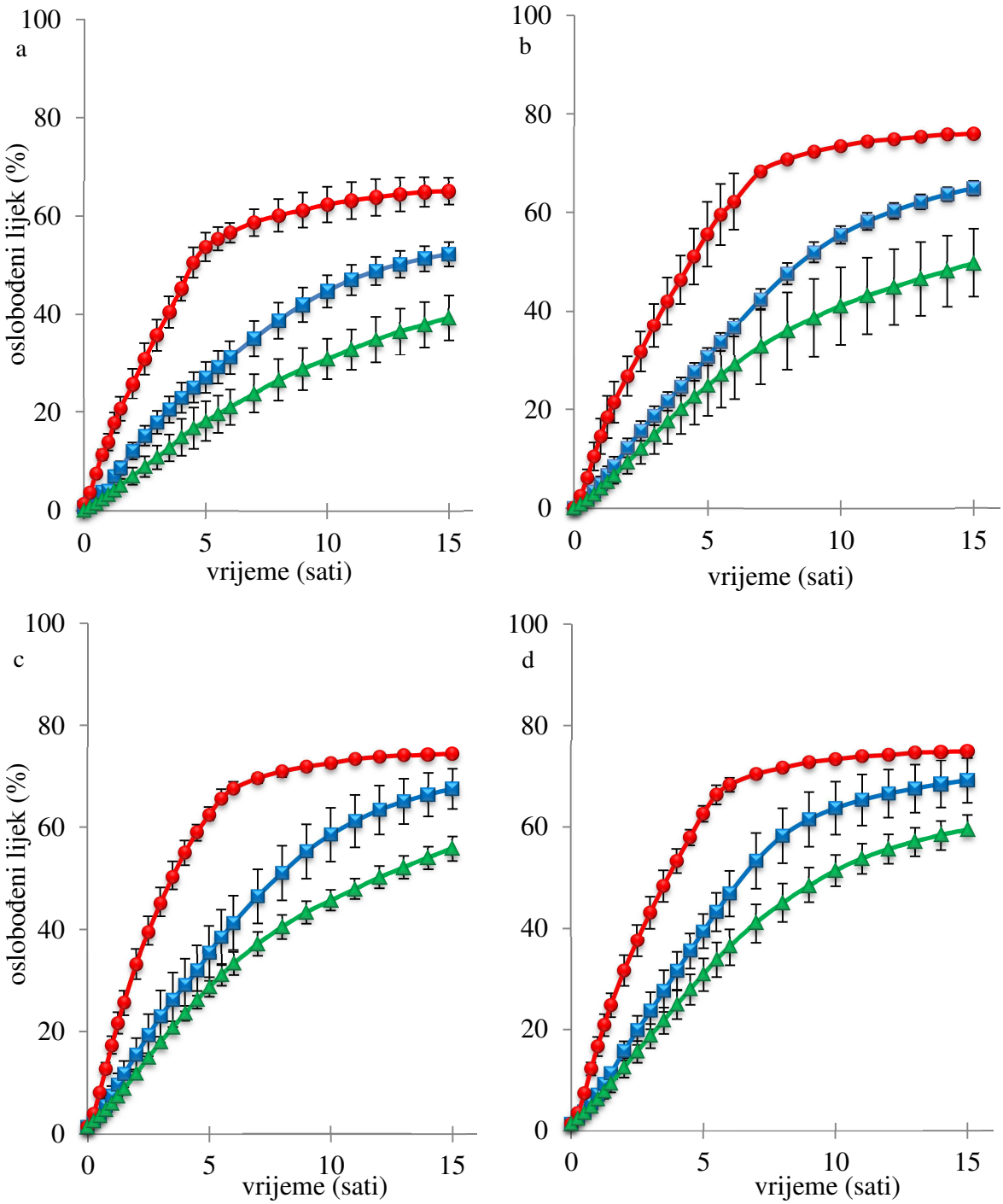
Inicijalna ispitivanja provedena u određenim medijima pri brzini lopatica od 100 okr./min obuhvatila su:

- SGF pH = 1,2 uz povećanje NaLS na 0,5 % [32]
- FaSSGH s dodatkom HCl do pH 2 [32]
- FaSSIF pH 6,5 [23].

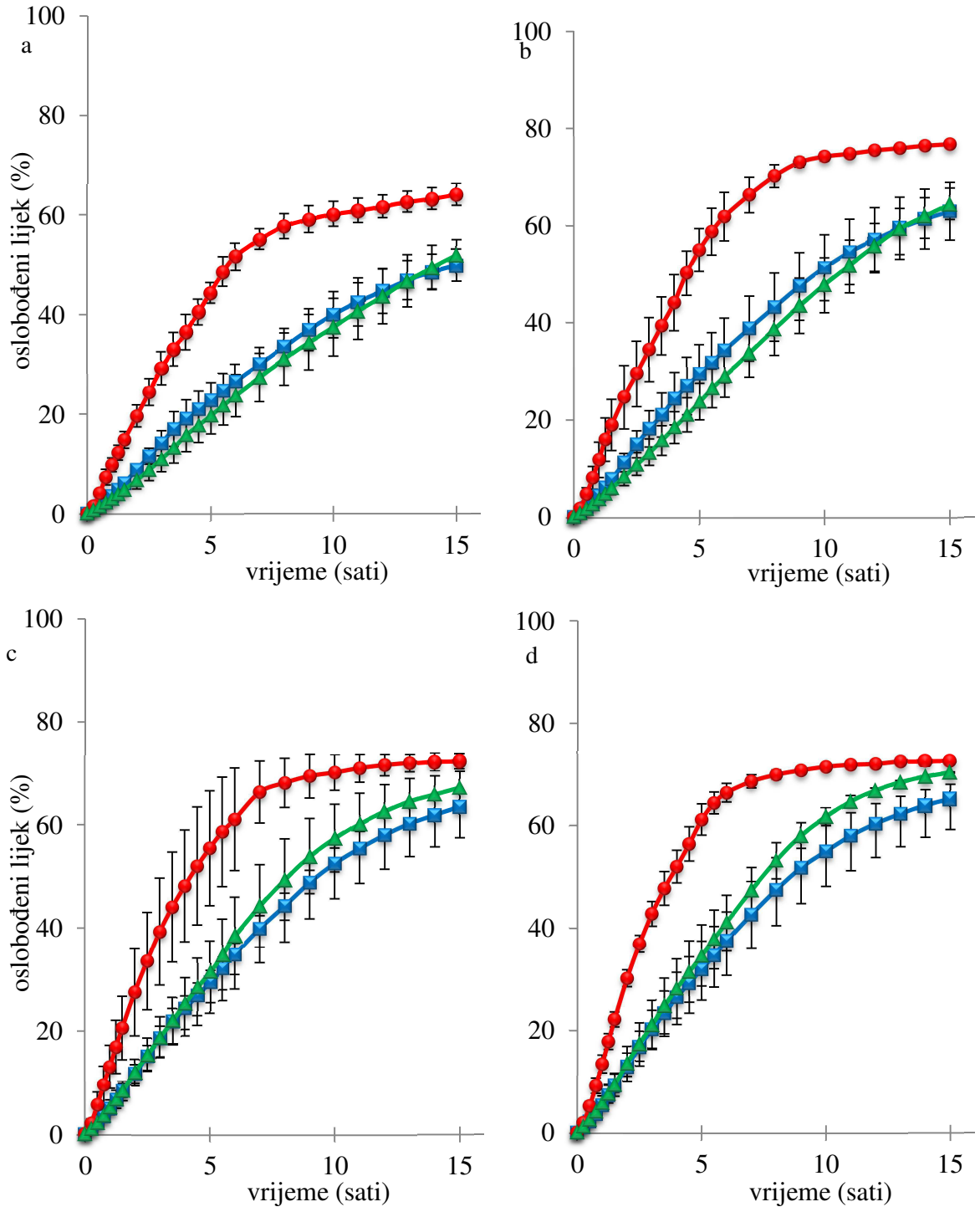
Ta su ispitivanja pokazala dosta niske i međusobno slične profile oslobađanja bez obzira na različitosti formulacija (do 10 – 15 % u medijima koji simuliraju uvjete u želudcu i do 30 % u mediju koji simulira uvjete u tankom crijevu – rezultati nisu prikazani). Dobivene niske vrijednosti oslobađanja u kiselome mediju u skladu su s podatcima iz literature [109].

Stoga se pristupilo daljnjem razvoju *in vitro* metode u medijima pH vrijednosti 4,5 i 6,8 uz dodatak 0,5 % NaCl i variranjem različitih koncentracija surfaktanta NaLS od 0,1 do 0,4 %, uz brzinu lopatica od 50 okr./min radi postizanja diskriminatornih uvjeta metode (**slike 12 i 13**). S obzirom na dozu i topljivost metaksalona, koja je dosta niska, *in vitro* medij zahtijevao je dodatak surfaktanta da bi se poboljšalo oslobađanje metaksalona iz ispitivanih formulacija [113], dok je natrijev klorid dodan radi povećanja ionske jakosti medija, koja može utjecati na stvaranje uvjeta za otapanje hidrofobnih djelatnih tvari poput metaksalona.

In vitro rezultati bili su različiti u medijima pH vrijednosti 4,5 i 6,8, u kojima su pokazali pH-ovisno oslobađanje metaksalona iz tableta. Prema očekivanjima, povećanje koncentracije surfaktanta pridonijelo je povećanju oslobađanja metaksalona u oba pH medija za sve ispitivane formulacije. Međutim, nijedna formulacija nije postigla 80 % doze oslobođenog lijeka unutar 15 sati, kada je ispitivanje završeno. Premda je otapanje metaksalona neovisno o pH vrijednostima medija, rezultati *in vitro* oslobađanja nisu iznenađujući jer su u ispitivanim formulacijama primijenjena različita veziva i dobiveni su rezultati u skladu s literaturnim podatcima [109]. Dobiveni rezultati pokazuju da formulacijski činitelji (različita veziva, HMPC i PVP u tabletama) utječu na *in vitro* oslobađanje lijeka i njihov bi se mehanizam djelovanja trebao dodatno ispitati.



Slika 12. Profili oslobađanja metaksalona iz formulacije A (●), formulacije B (▲) i Skelaxina® (■) u acetatnom puferu pH 4,5 s dodatkom 0,5 % NaCl i s (a) 0,1; (b) 0,2; (c) 0,3 i (d) 0,4 % NaLS pri brzini lopatica od 50 okr./min. Prikazane su srednje vrijednosti ± SD (n = 3 – 6).



Slika 13. Profili oslobađanja metaksalona iz formulacije A (●), formulacije B (▲) i Skelaxina® (■) u puferu pH 6,8 s dodatkom 0,5 % NaCl i s (a) 0,1; (b) 0,2; (c) 0,3 i (d) 0,4 % NaLS pri brzini lopatica od 50 okr./min. Prikazane su srednje vrijednosti ± SD (n = 3 – 6).

5.4. *In vivo* rezultati

Nakon što su zdravi dobrovoljci na prazan želudac uzeli oralnu otopinu, vrijednosti vršne koncentracije (cmax) i površine ispod krivulje (PIK) bile su značajno veće od vrijednosti za formulaciju tableta, što potvrđuje pretpostavku da je oslobađanje metaksalona iz formulacije ključni činitelj koji limitira njegovu apsorpciju. U većine je ispitanika vršna koncentracija metaksalona nakon primjene oralne otopine postignuta već u prvoj i/ili drugoj točki uzorkovanja (medijan vrijednost tmax = 1 sat), dok je vrijeme postizanja vršne koncentracije iz tableta postignuto kasnije (2 – 4,5 sati). Najkraće vrijeme do postizanja vršne koncentracije (tmax) zabilježeno je za formulaciju A (2 sata), za Skelaxin® je iznosilo 3,17 sati, dok je formulacija B pokazivala najsporije oslobađanje metaksalona s tmax vrijednošću od 4,5 sata. Srednja vrijednost vršne koncentracije otopine metaksalona iznosila je 14 065,03 ng/ml i bila je značajno viša od vršnih koncentracija metaksalon tableta. Najvišu vrijednost vršne koncentracije tableta postigla je formulacija A (2 254,66 ng/ml), zatim formulacija Skelaxina® (1 269,95 ng/ml) dok je najnižu vrijednost imala formulacija B (470,82 ng/ml). Sličan trend uočen je i za farmakokinetički parametar PIK. PIK (PIK_t, PIK_∞) oralne otopine bila je značajno viša od PIK vrijednosti formulacija tableta i iznosila je 38 818,77 ng·h/ml za PIK_t i 39 057,46 ng·h/ml za PIK_∞. Najvišu vrijednost PIK_t i PIK_∞ za tablete imala je formulacija A (13 933,38 i 14 521,78 ng·h/ml), zatim Skelaxin® (11 158,92 i 13 667,85 ng·h/ml), dok je najnižu vrijednost imala formulacija B (6876,94 i 7987,55 ng·h/ml). Konstanta eliminacije (k) nije se mogla ispravno procijeniti u ispitanika br. 11 u slučaju primjene formulacije A, ispitanika br. 4, 12, 15, 16 i 17 za formulaciju B i ispitanika br. 12 za formulaciju Skelaxina®. Ti su ispitanici isključeni iz analize PIK_∞, $PIK_{t/\infty}$, k i $t_{1/2}$ za odgovarajuću formulaciju, pa je ukupan broj ispitanika za navedene farmakokinetičke parametre kod formulacije A bio 17, kod formulacije B 13, a za Skelaxin® 17. Vrijeme polueliminacije ($t_{1/2}$) oralne otopine iznosilo je 1,49 sata i dosta se razlikovalo od $t_{1/2}$ vijednosti tableta. Vrijednost $t_{1/2}$ formulacije A bila je 5,51 sat, što je značajno kraće od $t_{1/2}$ Skelaxina® i formulacije B, koje je iznosilo 12,40 odnosno 11,51 sati.

Srednja vrijednost omjera $PIK_{t/\infty}$ bila je viša od 80 % za ispitanike uključene u analizu, što pokazuje da je trajanje uzorkovanja metaksalona u krvi u vremenu od 48 sati bilo odgovarajuće.

Srednje vrijednosti farmakokinetičkog parametara metaksalona (PIK_t, PIK_∞, $PIK_{t/\infty}$, cmax, k, $t_{1/2}$) i medijan vrijednosti vremena postizanja vršne koncentracije prikazani su u **tablici 17**, a na **slici 14** vide se srednje krivulje koncentracije metaksalona u plazmi.

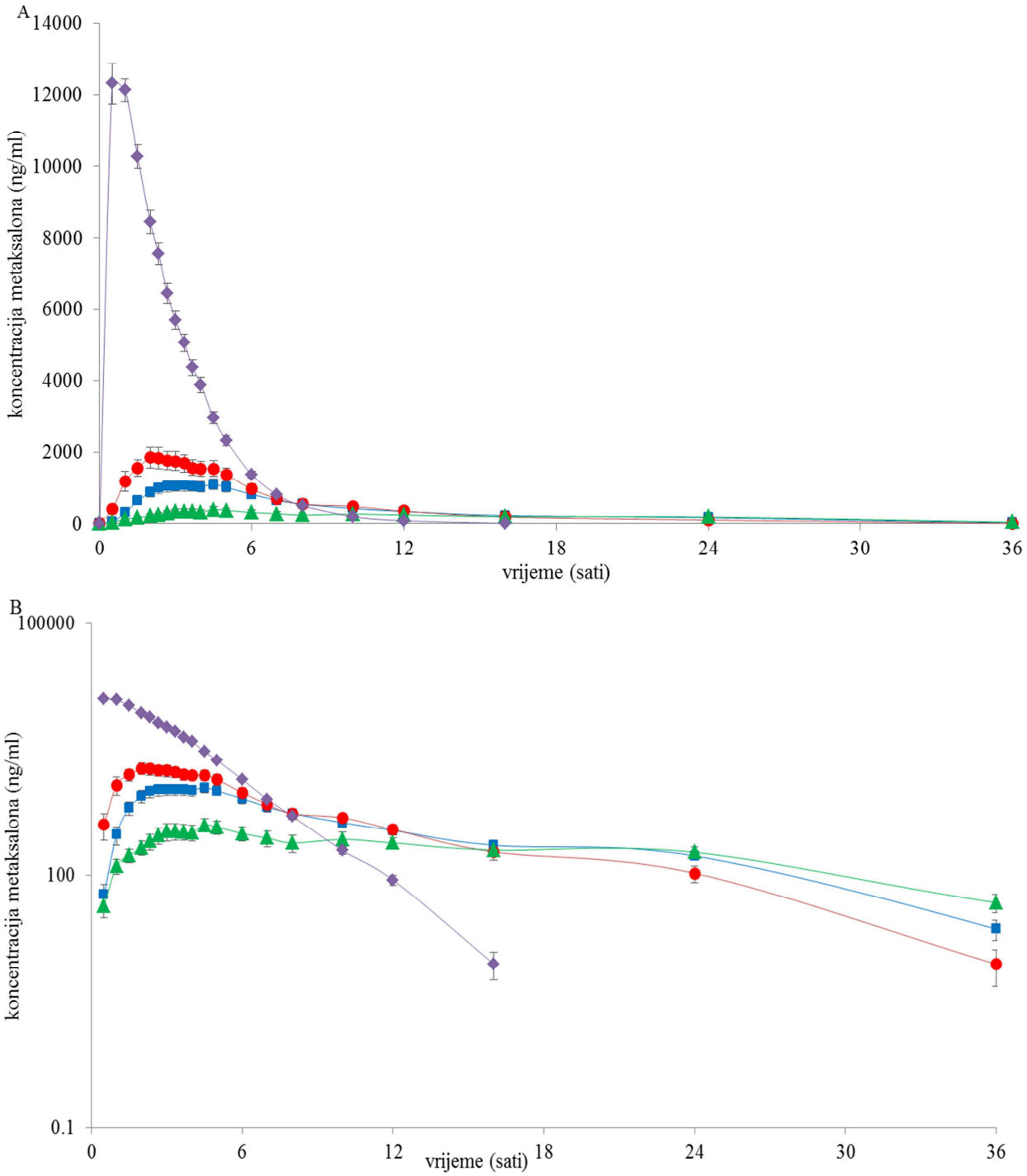
Tablica 17. Farmakokinetički parametri ispitivanih formulacija

Parametar	**A**	**B**	**Skelaxin®**	**Oralna otopina***
	(srednja vrijednost ± SD)			
PIK_t (ng·h/ml)	13 933,38 ± 6646,6	6876,94 ± 3793,2	11 158,92 ± 5160,7	38 818,77 ± 11 820,1
PIK_∞ ng·h/ml	14 521,78 ± 6898,9**	7987,55 ± 4132,3**	13 667,85 ± 5518,3**	39 057,46 ± 1188,9
$PIK_{t/\infty}$ (%)	94,98 ± 5,05**	87,17 ± 8,95**	84,19 ± 18,02**	99,37 ± 0,3
cmax (ng/ml)	2254,66 ± 1162,1	470,82 ± 300,9	1269,95 ± 608,4	14 065,03 ± 3322,9
tmax (h)* **	2,0 ± 1,46	4,5 ± 6,16	3,17 ± 2,09	1,0 ± 0,5
***k* (h^{-1})**	0,168 ± 0,1**	0,077 ± 0,04**	0,079 ± 0,03**	0,489 ± 0,1
$t_{1/2}$ (h)	5,51 ± 2,7**	11,51 ± 6,4**	12,40 ± 12,14**	1,49 ± 0,4

*Farmakokinetički parametri oralne otopine normalizirani su na istu dozu kao i tablete.

**Za te je parametre broj ispitanika bio 17 za A, 13 za B i 17 za Skelaxin®.

***Medijan vrijednost.



Slika 14. Profili srednjih vrijednosti koncentracija metaksalona u plazmi formulacije A (●), formulacije B (▲), Skelaxina® (■) i oralne otopine normalizirane na 800 mg (♦), primijenjenih na prazan želudac na zdravim dobrovoljcima. Prikazane su srednje vrijednosti ± SEM (n = 18), A – linearna skala, B – polulogaritamska skala [preuzeto i prilagođeno prema 112 uz dozvolu Springer Nature].

Izračunan je omjer najmanjih kvadrata (engl. *least square means*) ln-transformiranih geometrijskih srednjih vrijednosti glavnih farmakokinetičkih parametara (PIK_t i cmax), kao i 90-postotni interval pouzdanosti za različite formulacije metaksalon tableta u usporedbi s otopinom te formulacija A i B u odnosu prema Skelaxinu® (**tablica 18**).

Omjer površine ispod koncentracijske krivulje tijekom intervala uzorkovanja (PIK_t) metaksalon tableta u odnosu prema oralnoj otopini bio je najviši za formulaciju A i iznosio je 33,54 %. Nešto niži bio je omjer Skelaxina® i iznosio je 26,99 %, dok je najniži omjer u odnosu prema oralnoj otopini imala formulacija B i iznosio je 15,59 %. Još veća razlika u formulacijama u odnosu prema oralnoj otopini pokazala se u omjeru vršne koncentracije, koja je mjera za brzinu apsorpcije. Omjer vršne koncentracije metaksalon tableta u usporedbi s oralnom otopinom bio je najviši za formulaciju A i iznosio je 14,56 %. Nešto niži bio je omjer Skelaxina® i iznosio je 8,35 %, dok je najniži omjer imala formulacija B, a iznosio je 2,95 %. Za sve je formulacije u odnosu prema oralnoj otopini 90-postotni interval pouzdanosti bio izvan propisanih bioekvivalencijskih kriterija. Niski rezultati relativne bioraspoloživosti tableta u usporedbi s oralnom otopinom impliciraju da je oslobađanje metaksalona iz formulacija limitirajući činitelj koji utječe na njegovu *in vivo* apsorpciju.

Također, obje razvojne formulacije, ni A ni B, nisu bile bioekvivalentne s referentnom formulacijom Skelaxina® (**tablica 18**). Formulacija A pokazuje brže oslobađanje metaksalona u odnosu prema Skelaxinu®, a formulacija B pokazuje sporije oslobađanje metaksalona u usporedbi sa Skelaxinom®, što je potrebno za diferencijaciju profila tijekom uspostave IVIVC-a. Razvojne formulacije A i B razlikuju se po koncentraciji i vrsti veziva (HPMC-u i PVP-u) te po zanemarivoj razlici u koncentraciji sredstva za raspadanje – natrijeva škroboglikolata. Za obje formulacije provedena su standardna fizikalna ispitivanja koja su obuhvatila sitene analize, čvrstoću i raspadljivost tableta. Rezultati dobiveni tim ispitivanjima nisu korelirali s podatcima koji su dobiveni u *in vivo* ispitivanjima, stoga se nisu smatrali značajnima za uspostavu IVIVC modela.

Varijabilnost farmakokinetičkih parametara za svakoga pojedinog ispitanika bila je visoka i iznosila je 34,44 % za cmax i 29,15 % za PIK.

Tablica 18. Omjeri, 90-postotni interval pouzdanosti i koeficijent varijabilnosti unutar pojedinog ispitanika

Parametar	Formulacija	Referentna formulacija	Omjer (%)	90-postotni interval pouzdanosti	Intra-CV (%)
cmax	A	Skelaxin®	174,32	144,48 – 210,32	34,44 %
	B		35,38	29,34 – 42,66	
PIK_t	A	Skelaxin®	124,20	105,82 – 145,77	29,15 %
	B		57,75	49,23 – 67,75	
cmax	A	oralna otopina	14,56	12,07 – 17,55	34,44 %
	B		2,95	2,45 – 3,56	
	Skelaxin®		8,35	6,92 – 10,08	
PIK_t	A	oralna otopina	33,54	28,58 – 39,35	29,15 %
	B		15,59	13,28 – 18,3	
	Skelaxin®		26,99	22,99 – 31,68	

Osim izračuna farmakokinetičkih parametara neprostornom analizom podataka uz pomoć softvera WinNonLin, verzija 6.4 (Phoenix, Certara), izračun glavnih farmakokinetičkih parametara (PIK_t i cmax) korištenih za *in vitro-in vivo* korelaciju proveden je primjenom jednoprostornog modela s procesom apsorpcije prvog reda (jednadžba 23) upotrebom programa Wolfram Mathematica 11.1. Rezultati prostornog modela (**tablica 19**) dali su usporedive podatke s neprostornom analizom (**tablica 17**), što dodatno potvrđuje adekvatan izbor IVIVC metodologije koja se koristi prostornim modelom [91]. Jednoprostorni model s apsorpcijom prvog reda izabran je uzimanjem u obzir izgled farmakokinetičkog profila oralne otopine na polulogaritamskoj skali i Akaike informacijskog kriterija (engl. *Akaike information criterion, AIC*), koji je imao nižu vrijednost od AIC vrijednosti dobivene odabirom dvoprostornog modela (rezultati nisu prikazani).

Tablica 19. Rezultati farmakokinetičkih parametara PIK_t i cmax dobiveni primjenom prostornog modela

Parametar	A	B	Skelaxin®	Oralna otopina*
	(srednja vrijednost ± SD)			
PIK_t (ng·h/ml)	14 603,24 ± 7291,92	6768,05 ± 3854,4	11 508,24 ± 6010,22	39 147,41 ± 15 105,88
cmax (ng/ml)	2274,58 ± 1169,5	472,94 ± 303,21	1283,18 ± 615,17	14 149,73 ± 3342,6

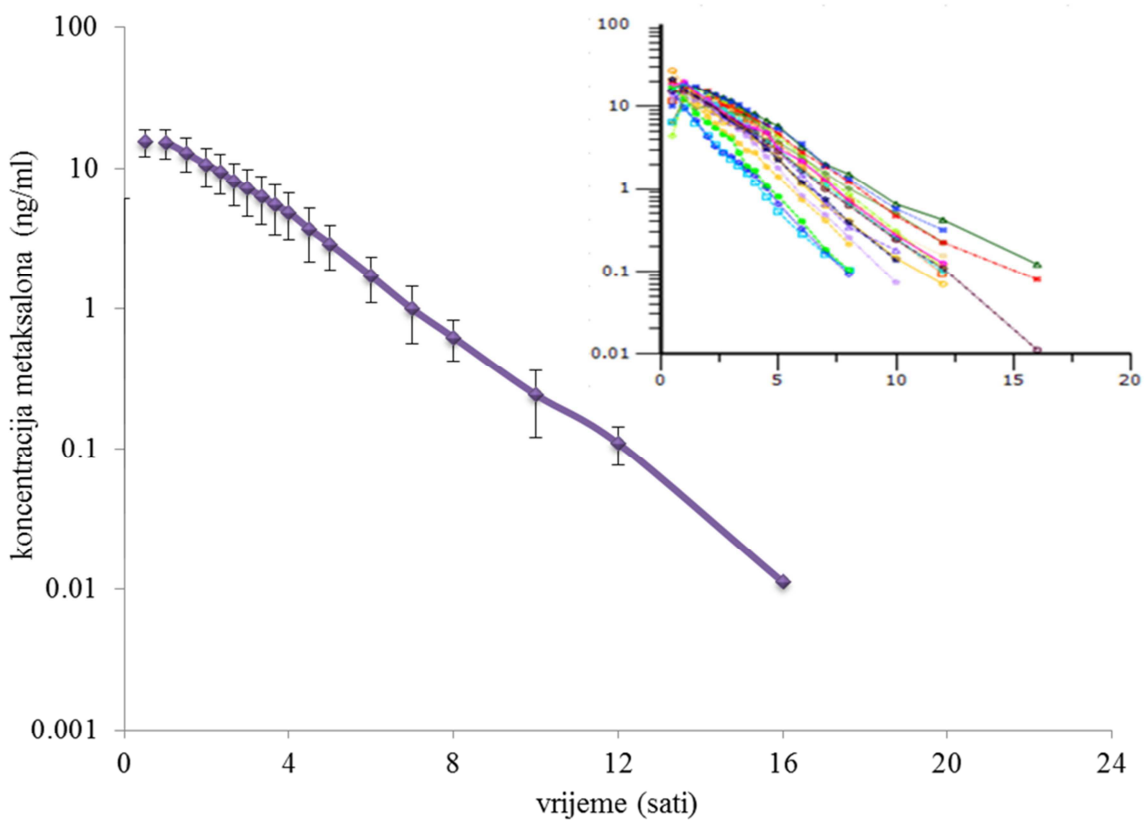
*Farmakokinetički parametri oralne otopine normalizirani su na istu dozu kao i tablete.

Srednje i individualne koncentracije metaksalona u plazmi nakon primjene oralne otopine metaksalona i nakon normalizacije doze na jediničnu vrijednost iskorištene su za izračun parametara jediničnoga impulsnog odgovora $C_\delta(t)$.

Logaritmiranjem vrijednosti koncentracija metaksalona u vremenu postaje očito da se farmakokinetika oralne otopine metaksalona može opisati modelom s jednim odjeljkom. **Slika 15** prikazuje srednju vrijednost metaksalona nakon primjene oralne otopine i individualne krivulje. S obzirom na trenutačnu apsorpciju oralne otopine nakon primjene (u većine ispitanika vršna je koncentracija postignuta u prvoj vremenskoj točki uzorkovanja), farmakokinetički model jednog odjeljka intravenske primjene najbolje opisuje krivulje:

$$C(t) = A \times e^{k \cdot t} \tag{31}$$

Kad profili prate model s jednim odjeljkom, parametar A (odsječak je na osi y) može se izračunati iz formule A = doza/V_d .Volumen distribucije V_d i parametar k koji označava konstantu eliminacije izračunani su neprostornom analizom podataka uz pomoć softvera WinNonLin, verzija 6.4. Parametri A i k prikazani u **tablici 20** su iskorišteni za dekonvoluciju koncentracijskih krivulja ispitivanih tableta izmjerenih u bioekvivalencijskoj studiji.



Slika 15. Srednja vrijednost koncentracije metaksalona nakon primjene oralne otopine normalizirane na 1 mg (♦) na polulogaritamskoj skali. Prikazane su srednje vrijednosti ± SD (n = 18). Manja slika prikazuje individualne koncentracijske krivulje oralne otopine.

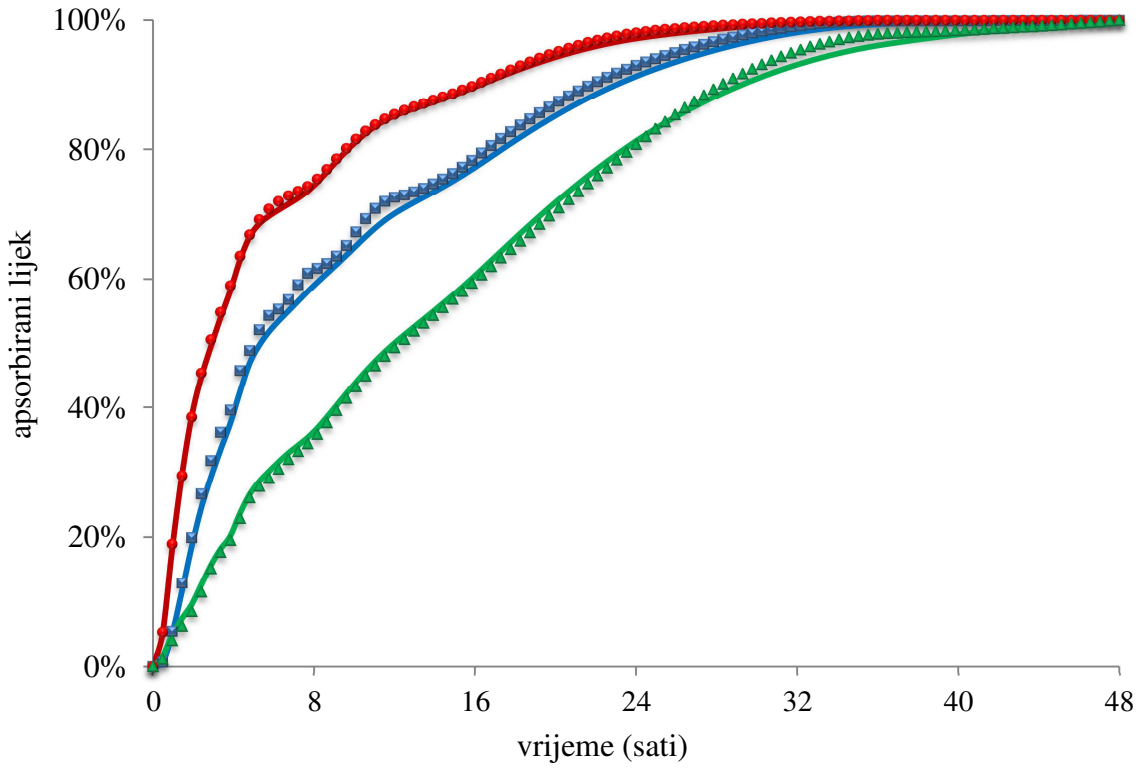
Tablica 20. Parametri A i *k* individualnih koncentracijskih krivulja i srednje vrijednosti koncentracijske krivulje nakon primjene oralne otopine

Ispitanik	A (ng/ml)	*k* (h^{-1})	Ispitanik	A (ng/ml)	*k* (h^{-1})
1.	24,165	0,520	**10.**	26,744	0,460
2.	23,609	0,556	**11.**	26,265	0,359
3.	28,602	0,525	**12.**	12,113	0,635
4.	29,103	0,525	**13.**	16,411	0,687
5.	26,599	0,645	**14.**	28,376	0,571
6.	19,944	0,419	**15.**	26,861	0,489
7.	21,831	0,609	**16.**	27,258	0,479
8.	23,828	0,456	**17.**	21,228	0,698
9.	26,859	0,393	**18.**	28,185	0,413
srednja vrijednost koncentracijske krivulje				24,142	0,495

5.4.1. Krivulje *in vivo* oslobađanja

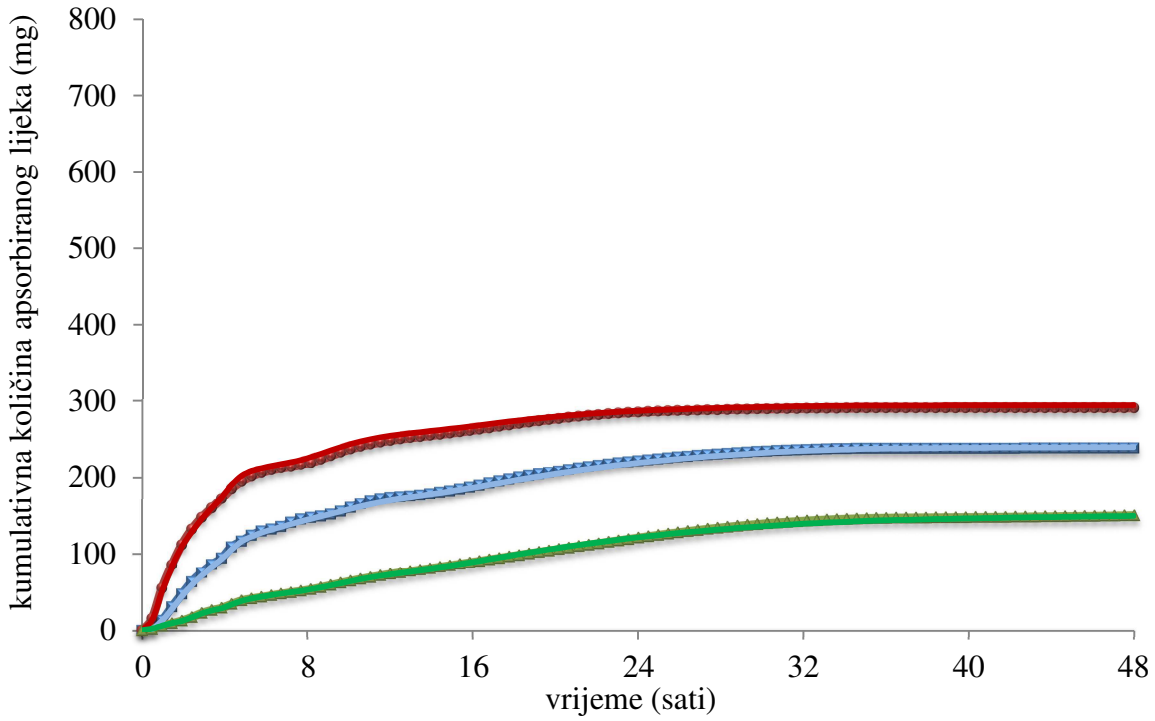
5.4.1.1. Metoda dekonvolucije

Korištenjem izmjerenih *in vivo* koncentracijskih krivulja c(t) ispitivanih tableta metaksalona i izračunanih parametara A i *k* oralne otopine koje opisuju jedinični impulsni odgovor $c_\delta(t)$, dekonvolucija konvolucijskog integrala daje vrijednosti impulsnog odziva *in vivo* sustava f(t) odnosno frakciju *in vivo* apsorbiranog lijeka. Za dekonvoluciju su primijenjena dva pristupa. U prvome su za izračun apsorpcijske krivulje uzete srednje vrijednosti koncentracija formulacija tableta u vremenu i srednja vrijednost parametara A i *k* oralne otopine. U drugom su pristupu individualne krivulje metaksalon tableta i individualni parametri oralne otopine svakog ispitanika (A i *k*) iskorišteni za dekonvoluciju podataka i zatim je prema regulatornim smjernicama izračunana srednja vrijednost apsorpcijske krivulje (**slika 16)** [3, 79]. Korištenjem oba pristupa, dobiveni su vrlo slični profili *in vivo* apsorpcije metaksalona.



Slika 16. Rezultati dekonvolucije korištenjem srednjih i individualnih vrijednosti metaksalona *in vivo* iz formulacije A (●), formulacije B (▲) i Skelaxina® (■). Rezultati dekonvolucijskog pristupa dobiveni korištenjem individualnih vrijednosti prikazani su punim linijama.

Osim frakcije lijeka apsorbiranoga *in vivo*, izračunana je i kumulativna količina apsorbiranog lijeka (**slika 17**). Iz kumulativne količine apsorbiranog lijeka vidljivo je da zbog slabog oslobađanja metaksalona dolazi do apsorpcije samo jednog dijela ukupno primijenjene doze lijeka. Iz formulacije A apsorbira se 290 mg metaksalona, odnosno 36 % doze. Iz formulacije Skelaxina® apsorbira se 238 mg metaksalona, tj. 30 % doze. Najmanja količina apsorbiranog lijeka zabilježena je za formulaciju B i iznosila je 149 mg metaksalona (19 % doze). Dobiveni rezultati dekonvolucije u skladu su s rezultatima relativne bioraspoloživosti testiranih formulacija tableta prikazanih u **tablici 18**. Ispitivanjem permeabilnosti na Caco-2 stanicama te bioekvivalencijskom studijom dokazano je da se metaksalon dobro apsorbira kad se primijeni kao otopina. Oralna otopina i formulacija A imaju znatno veću bioraspoloživost u usporedbi s referentnim lijekom Skelaxinom®, što upućuje na zaključak da formulacija lijeka ima važnu ulogu za bioraspoloživost metaksalona. Očito je da se metaksalon može formulirati na način da se poboljša bioraspoloživost postojećeg proizvoda na tržištu (Skelaxina®), uz mogućnost smanjenja doze/ broja dnevnih doza.

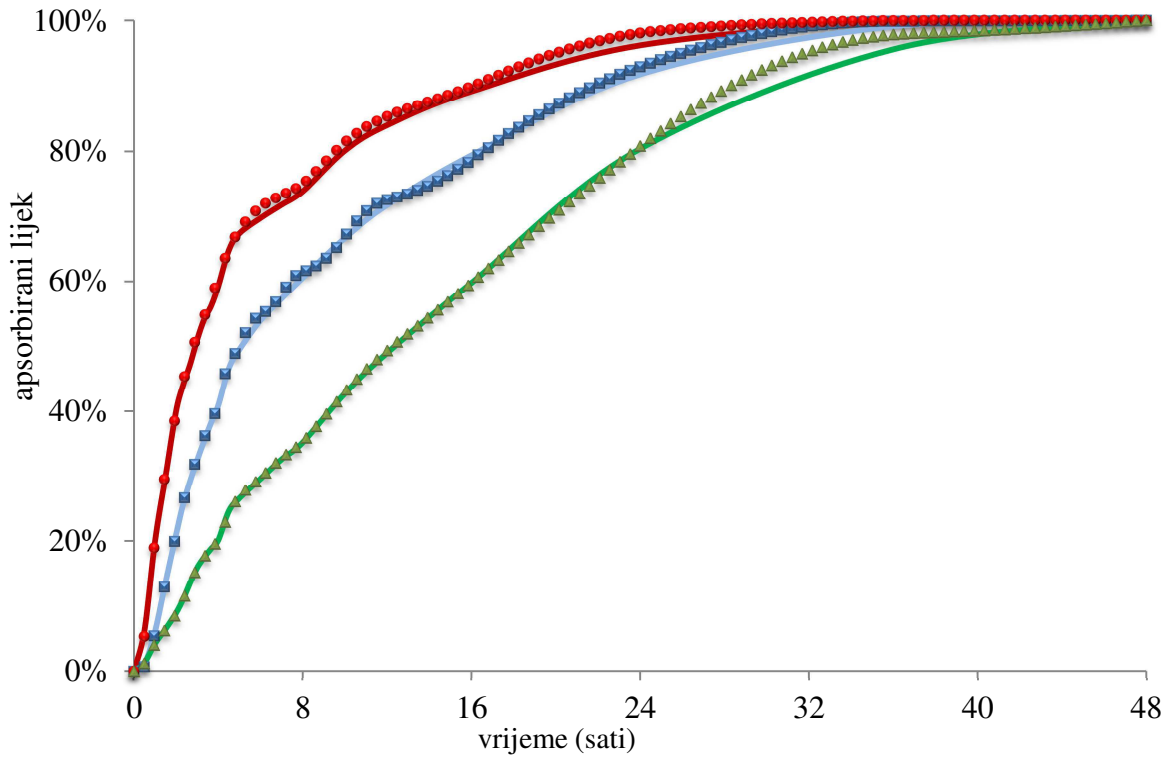


Slika 17. Kumulativna količina *in vivo* apsorbiranog metaksalona iz formulacije A (●), formulacije B (▲) i Skelaxina® (■). Rezultati dekonvolucijskog pristupa dobiveni na temelju individualnih vrijednosti prikazani su punim linijama.

5.4.1.2. Wagner-Nelsonova metoda

Premda rezultati oralne otopine pokazuju da se farmakokinetika metaksalona može opisati modelom jednog odjeljka i u tom se slučaju može primijeniti Wagner-Nelsonova metoda za izračun frakcije lijeka apsorbiranoga *in vivo*, za jedan dio individualnih koncentracija lijeka nakon primjene tableta nije bilo moguće odrediti konstantu eliminacije. Konstanta eliminacije (k) nije se mogla ispravno procijeniti za ispitanika br. 11 pri primjeni formulacije A, za ispitanike br. 4, 12, 15, 16 i 17 pri primjeni formulacije B te za ispitanika br. 12 pri primjeni formulacije Skelaxina®.

Usporedbom vrijednosti vremena polueliminacije oralne otopine i ispitivanih formulacija može se zaključiti da se modifikacijom formulacija dobivaju različite vrijednosti vremena polueliminacije lijeka. Dulje vrijeme polueliminacije lijeka za formulacije tableta u odnosu prema vremenu polueliminacije oralne otopine upućuje na to da se u tableta metaksalona može primijetiti „flip-flop fenomen“, tj. da je brzina apsorpcije lijeka sporija od njegove eliminacije. U tom slučaju terminalni dio koncentracijske krivulje ne daje informaciju o konstanti eliminacije već o konstanti apsorpcije [80]. Ako formulacija lijeka upućuje na „flip-flop kinetiku“, može doći do pogrešne procjene PIK_{∞} i apsorpcijske krivulje, pa se tada za primjenu Wagner-Nelsonove metode trebaju upotrijebiti konstante eliminacije oralne otopine [79]. Korištenjem iste konstante eliminacije u metodi dekonvolucije i u Wagner-Nelsonovoj metodi, dobiveni su vrlo slični profili *in vivo* oslobađanja/apsorpcije lijeka (**slika 18**).



Slika 18. Usporedba rezultata lijeka apsorbiranoga iz formulacije A (●), formulacije B (▲) i Skelaxina® (■) dekonvolucijom i Wagner-Nelsonovom metodom. Rezultati dobiveni Wagner-Nelsonovom metodom prikazani su punim linijama.

5.5. Uspostava i validacija IVIVC modela

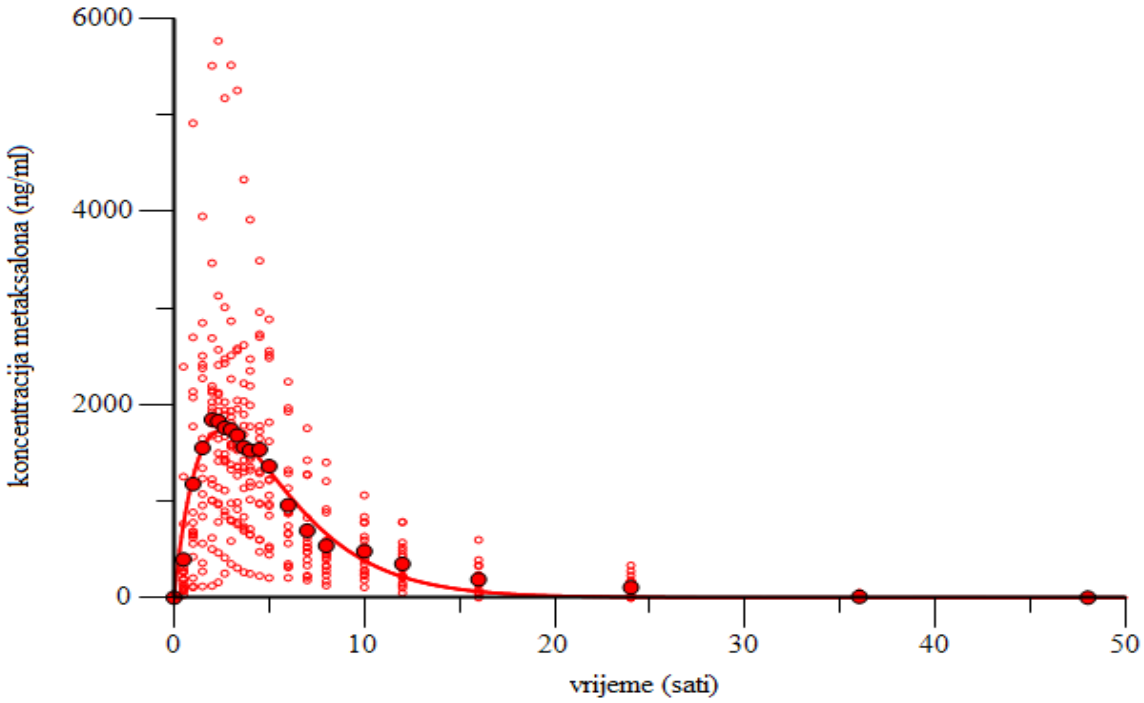
In vivo koncentracijske krivulje pokazivale su značajnu varijabilnost zbog nekoliko ispitanika koji su imali netipične vrijednosti (engl. *outliers*). U tom su slučaju srednje vrijednosti koncentracijskog profila osjetljive na postojanje *outliera* (pogotovo ako je broj ispitanika malen) i mogu biti nerealne, npr. multimodalnog izgleda. Tada primjena i interpretacija rezultata dobivenih metodom dekonvolucije može biti zahtjevna i dvosmislena [79]. IVIVC metodologija utemeljena na jednom koraku metoda je izbora jer zaobilazi aproksimacije povezane s dekonvolucijskim korakom [87]. Stoga je metoda diferencijalnih jednadžbi koje izravno povezuje brzinu *in vitro* oslobađanja lijeka i farmakokinetički prostorni model koji opisuje izmjerene koncentracijske krivulje u određenom vremenu korištena za razvoj IVIVC modela [91]. S obzirom na to da se farmakokinetika oralne otopine metaksalona može opisati jednoprostornim farmakokinetičkim modelom, model prikazan u jednadžbi 23. primijenjen je

za modeliranje individualnih profila ispitivanih formulacija tableta, a dobiveni su parametri navedeni u **tablici 21.** Parametar A označava odsječak na osi y, nagib pravca u zadnjim vremenskim točkama logaritmiranih vrijednosti koncentracije konstanta je eliminacije- k, dok je k_a konstanta apsorpcije.

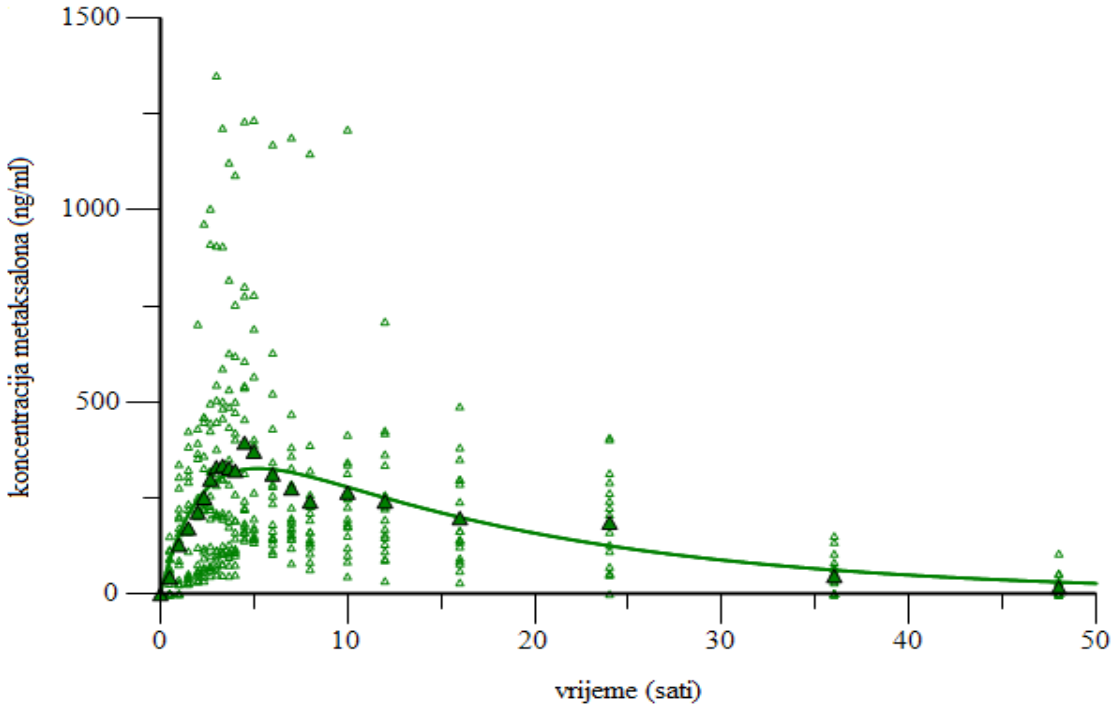
Tablica 21. Parametri jednoprostornog modela s apsorpcijom prvog reda dobiveni prilagođivanjem modela na individualne koncentracijske krivulje za ispitivane formulacije [preuzeto i prilagođeno prema 112 uz dozvolu Springer Nature]

Formulacija	**A (ng/ml)**	k **(h^{-1})**	k_a **(h^{-1})**
A	-15 858,622	0,451	0,335
B	509,223	0,058	0,450
Skelaxin®	-18 845,490	0,292	0,253
oralna otopina	11 000,000	0,484	2,654

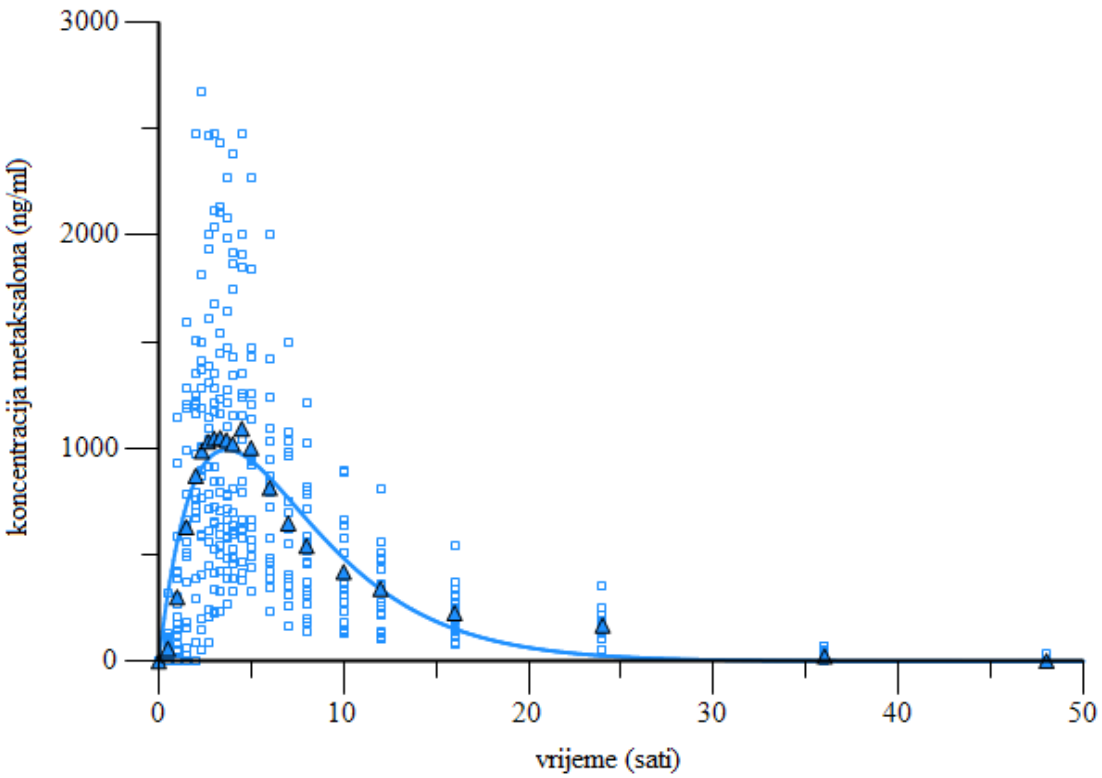
Slike 19, 20 i 21 prikazuju individualne vrijednosti koncentracijskih krivulja, srednje vrijednosti koja je rezultat aritmetičke sredine podataka i srednje vrijednosti dobivene modeliranjem individualnih koncentracijskih krivulja uz pomoć jednoprostornoga farmakokinetičkog modela za sve tri ispitivane formulacije tableta. Srednji koncentracijski profili dobiveni primjenom farmakokinetičkog modela daju pouzdanije srednje profile od onih koji se dobiju izračunavanjem aritmetičkih vrijednosti svih izmjerenih koncentracija u jednoj točki. Također je važno uočiti da korištenjem neprostornoga i prostornog pristupa farmakokinetički parametri (cmax i PIK) pokazuju slične vrijednosti (**tablice 17 i 19)**.



Slika 19. Izmjerene individualne vrijednosti (○), srednje vrijednosti dobivene aritmetičkom sredinom podataka (●) i modelirane srednje vrijednosti (puna linija) koncentracijskih krivulja za formulaciju A.



Slika 20. Izmjerene individualne vrijednosti (Δ), srednje vrijednosti dobivene aritmetičkom sredinom podataka (▲) i modelirane srednje vrijednosti (puna linija) koncentracijskih krivulja za formulaciju B.



Slika 21. Izmjerene individualne vrijednosti (□), srednje vrijednosti dobivene aritmetičkom sredinom podataka (▲) i modelirane srednje vrijednosti (puna linija) koncentracijskih krivulja za formulaciju Skelaxina®.

Dobiveni profili lijeka apsorbiranoga *in vivo*, prikazani na **slici 16 i 17** ispitivanih formulacija tableta metaksalona, pokazuju da formulacija A ima najviši profil, slijedi referentna formulacija Skelaxina®, a formulacija B imala je najniži profil. Profili *in vitro* oslobađanja lijeka, koji su pokazivali sličan trend kao i *in vivo* profili, korišteni su za uspostavu kategorije A IVIVC-a, odnosno najvišeg stupnja korelacije koja označava funkcionalnu povezanost svih točaka krivulje *in vitro* i *in vivo* oslobađanja. Profili lijeka apsorbiranoga *in vivo* dobiveni metodom dekonvolucije korišteni su samo u preliminarnoj fazi uspostave IVIVC-a, tj. pri odabiru *in vitro* medija.

Rezultati *in vitro* ispitivanja, uz primjenu USP metode, pokazali su da preporučena metoda nije klinički relevantna za predikciju ponašanja metaksalon tableta *in vivo* jer nije pokazivala sličan trend kao i rezultati dobiveni *in vivo* (**slika 11**).

Identificirani *in vitro* mediji koji su pokazivali sličan trend kao *in vivo* profili bili su:

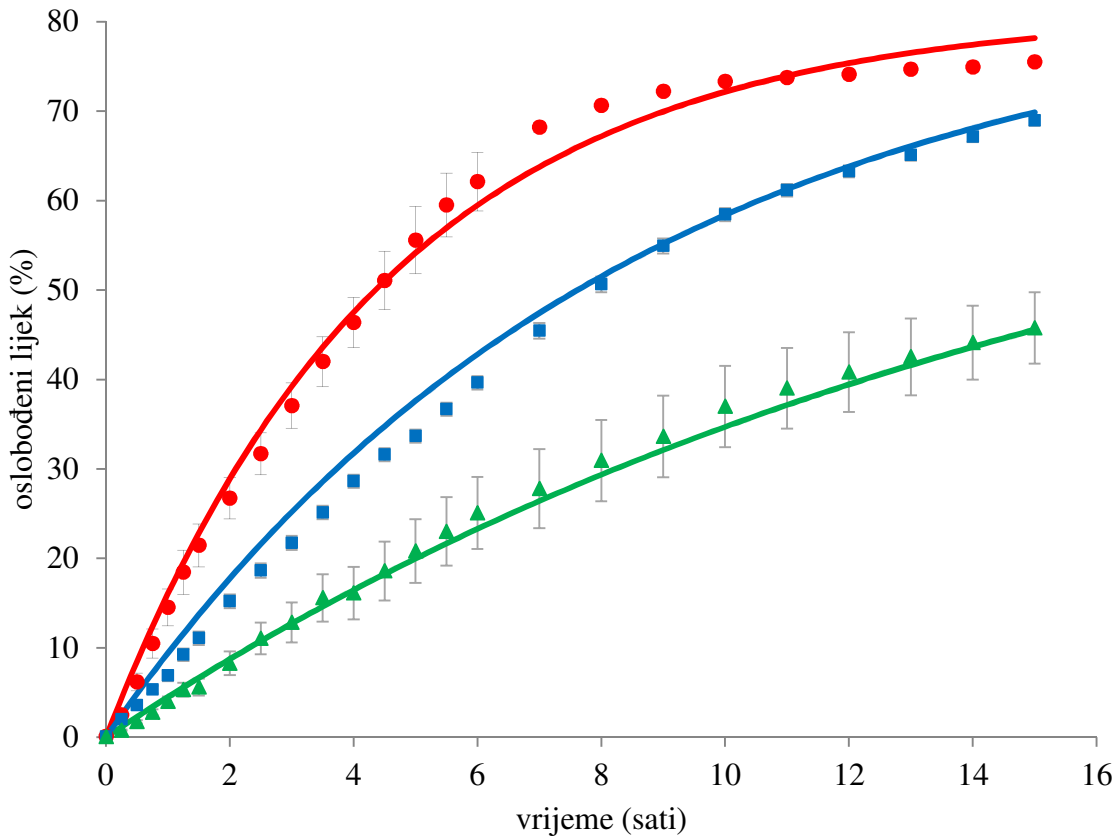
- USP acetatni pufer pH vrijednosti 4,5 s dodatkom 0,5 % NaCl i 0,1 % NaLS
- USP acetatni pufer pH vrijednosti 4,5 s dodatkom 0,5 % NaCl i 0,2 % NaLS
- USP acetatni pufer pH vrijednosti 4,5 s dodatkom 0,5 % NaCl i 0,3 % NaLS
- USP acetatni pufer pH vrijednosti 4,5 s dodatkom 0,5 % NaCl i 0,4 % NaLS
- fosfatni pufer pH vrijednosti 6,8 s dodatkom 0,5 % NaCl i 0,1 % NaLS
- fosfatni pufer pH vrijednosti 6,8 s dodatkom 0,5 % NaCl i 0,2 % NaLS.

U sljedećem koraku rezultati *in vitro* ispitivanja u fosfatnom puferu pH vrijednosti 6,8 s dodatkom 0,5 % NaCl i 0,1 ili 0,2 % NaLS odbačeni su iz daljnje uspostave IVIVC modela jer su razlike u profilima između formulacije B i Skelaxina® iznosile manje od 6 %. Razlika *in vivo* između te dvije formulacije bila je prevelika – omjer za vršnu koncentraciju iznosio je 35,38 %, odnosno 57,75 % za PIK (**tablica 18**), da bi se uz tako male razlike u *in vitro* rezultatima mogao razviti adekvatan IVIVC model (**slike 13a i 13b**). IVIVC model uspostavljen na temelju *in vitro* podataka u acetatnom puferu pH vrijednosti 4,5 s dodatkom 0,5 % NaCl i 0,1; 0,3 i 0,4 % NaLS, prikazan u **tablici 22,** odbačen je zbog pogreške predikcije modela koja je bila viša od propisanih kriterije prihvatljivosti [2, 3]. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da navedeni *in vitro* mediji ne opisuju adekvatno ponašanje metaksalona *in vivo*.

Tablica 22. Pogreške predikcije (% PE) IVIVC modela na temelju *in vitro* podataka u acetatnom puferu pH vrijednosti 4,5 s dodatkom 0,5 % NaCl i 0,1; 0,3 i 0,4 % NaLS

Medij	**Parametar**	**A**	**B**	**Skelaxin®**	**Ukupna pogreška predikcije**
pH 4,5	% PE cmax	19,40	5,77	46,13	23,77
+0,5 % NaCl+0,1% NaLS	% PE PIK_t	0,71	7,44	8,02	5,39
pH 4,5	% PE cmax	2,52	54,98	29,20	28,90
+0,5 % NaCl+0,3% NaLS	% PE PIK_t	19,31	34,88	18,69	24,29
pH 4,5	% PE cmax	2,30	68,58	19,96	30,28
+0,5 % NaCl+0,4% NaLS	% PE PIK_t	17,73	48,36	21,32	29,14

Rezultati modeliranja dobivenih profila *in vitro* u acetatnom puferu pH vrijednosti 4,5 s dodatkom 0,5 % NaCl i 0,2 % NaLS prikazani su na **slici 22**, a dobiveni su parametri navedeni u **tablici 23**. Primijenjena jednostavna varijanta eksponencijalnog modela navedena u jednadžbi (28) adekvatno je opisala sve tri formulacije.



Slika 22. Modeliranje podataka (prikazano punim linijama) za formulaciju A (●), formulaciju B (▲) i Skelaxin® (■) dobivenih u *in vitro* u acetatnom puferu pH vrijednosti 4,5 s dodatkom 0,5 % NaCl i 0,2 % NaLS [preuzeto i prilagođeno prema 112 uz dozvolu Springer Nature].

Tablica 23. Rezultati modeliranja *in vitro* podataka dobivenih u mediju pH 4,5 + 0,5 % NaCl + 0,2 % SLS-a [preuzeto i prilagođeno prema 112 uz dozvolu Springer Nature]

Formulacija	**α**	**λ**
A	0,8116	0,2200
B	0,7600	0,0610
Skelaxin®	0,8403	0,1187

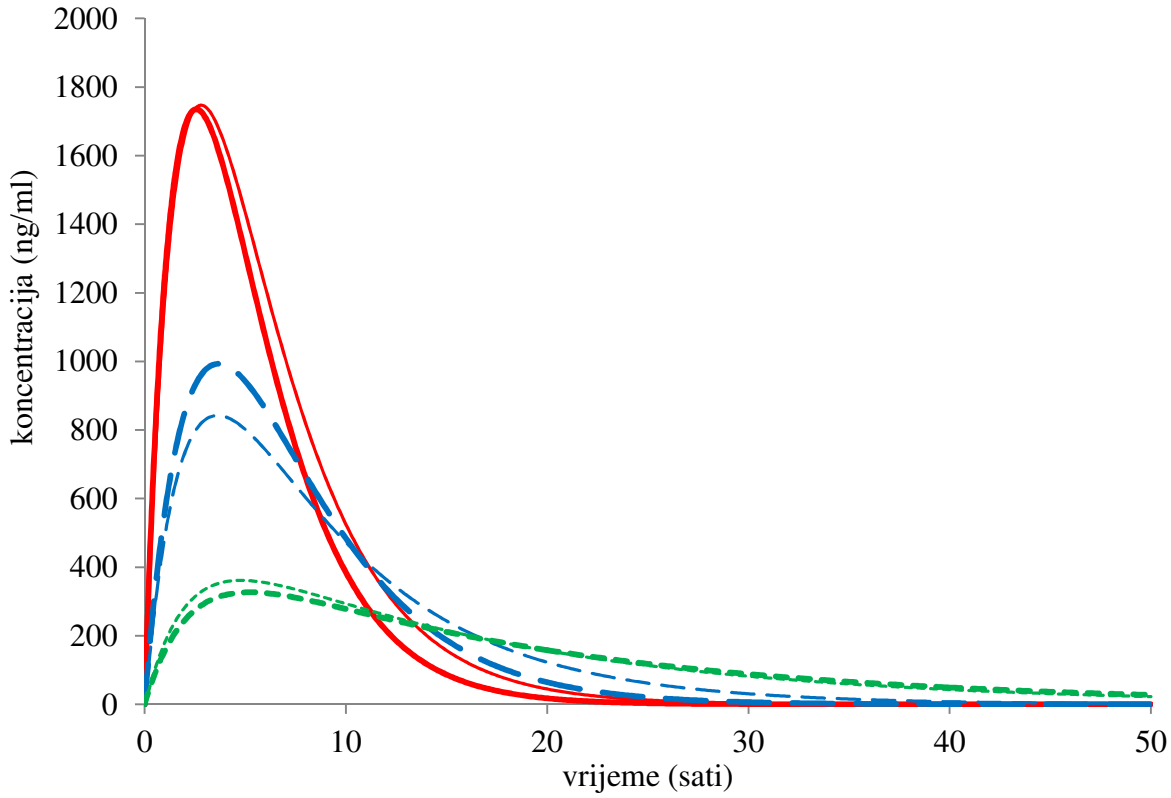
Ostali parametri u predikciji *in vivo* koncentracija izračunani su prilagođivanjem modela u jednadžbi (29) s *in vitro* parametrima u acetatnom puferu pH vrijednosti 4,5 s dodatkom 0,5 % NaCl i 0,2 % NaLS (**tablica 23**) na dobivene *in vivo* koncentracijske krivulje. **Tablica 24** prikazuje parametre dobivene iz predikcijskoga *in vivo* koncentracijskog modela jednadžbe (29).

Tablica 24. Vrijednosti parametara razvijenoga IVIVC modela [preuzeto i prilagođeno prema 112 uz dozvolu Springer Nature]

Parametar	s_r	b_o	b_1	**k (h^{-1})**
vrijednost	4450	-3,6	1,16	0,49

Samo se parametri koji opisuju brzinu oslobađanja ($\boldsymbol{\lambda}$ i $\boldsymbol{\alpha}$) razlikuju za sve tri formulacije, dok su svi ostali parametri koji opisuju krivulju za ispitivane formulacije jednaki. Isti faktor skaliranja primijenjen je za sva tri *in vitro* profila i uključen je u matematički model da se uspostavi IVIVC [114]. Sigmoidalna padajuća funkcija, koja uzima u obzir varijabilnost apsorpcije lijeka tijekom prolaska kroz gastrointestinalni trakt, nije pridonijela poboljšanju dobivenih rezultata. Rezultati konstante eliminacije ($\boldsymbol{k}$ = 0,49 h^{-1}) dobiveni modelom izvrsno se slažu s konstantom eliminacije oralne otopine koja je izračunana neprostornom analizom podataka dobivenih u bioekvivalencijskoj studiji (**tablica 17**). Rezultati izmjerenih koncentracija metaksalona dobiveni primjenom jednoprostornog modela s procesom apsorpcije prvog reda (jednadžba 23) i predviđenih koncentracija lijeka u plazmi koje su izračunane na temelju IVIVC modela utemeljenoga na diferencijalnim jednadžbama (jednadžba 29) prikazani su na **slici 23**.

Usporedbom profila dokazano je da razvijeni IVIVC model direktnih, diferencijalnih jednadžbi daje jednoznačnu povezanost između *in vitro* oslobađanja lijeka u acetatnom puferu pH vrijednosti 4,5 s dodatkom 0,5 % NaCl koji sadržava 0,2 % surfaktanta i *in vivo* koncentracijske krivulje.



Slika 23. Usporedba predviđenih koncentracija metaksalona za formulacija A (crvena linija), formulaciju B (zelena linija) i Skelaxin® (plava linija) s izmjerenim koncentracijama lijeka u plazmi koje su dobivene farmakokinetičkim modeliranjem (označene debljim linijama). Predviđene vrijednosti izračunane su primjenom IVIVC modela preporučene *in vitro* metode oslobađanja lijeka [preuzeto i prilagođeno prema 112 uz dozvolu Springer Nature].

Farmakokinetički parametri dobiveni iz koncentracija lijeka izmjerenih podataka (modeliranih jednoprostornim modelom s procesom apsorpcije prvog reda) i predviđenih podataka dobivenih direktnom metodom korištenjem diferencijalnih jednadžbi za uspostavu IVIVC modela korišteni su za validaciju modela. Izmjereni i predviđeni farmakokinetički parametri navedeni su u **tablici 25**.

Dobiveni podatci prikazani na **slici 23** i **tablici 25** pokazuju da razvijeni IVIVC model dobro predviđa cijeli koncentracijski profil metaksalona u plazmi, uključujući glavne farmakokinetičke parametre PIK_t i cmax.

Tablica 25. Izmjereni i predviđeni farmakokinetički parametri [preuzeto i prilagođeno prema 112 uz dozvolu Springer Nature]

Formulacija	Vrsta podatka	cmax (ng/ml)	PIK_t (ng·h/ml)
A	izmjeren	1733,88	12 237,57
	predviđen	1758,29	14 000,69
B	izmjeren	326,62	7120,15
	predviđen	362,23	7296,19
Skelaxin®	izmjeren	993,04	9940,88
	predviđen	845,31	10 068,14

Točnost predviđanja razvijenoga IVIVC modela procijenjena je na osnovi izračuna postotka pogreške predikcije, koja se definira kao relativni odnos razlike između izmjerene i predviđene vrijednosti farmakokinetičkih parametara – vršne koncentracije i površine ispod krivulje.

Tablica 26. Pogreška predikcije IVIVC modela [preuzeto i prilagođeno prema 112 uz dozvolu Springer Nature]

Formulacija	% PE cmax	% PE PIK_t
A	1,41 %	14,41 %
B	10,90 %	2,47 %
Skelaxin®	14,88 %	1,28 %
ukupna pogreška predikcije	9,06 %	6,05 %

Prema regulatornim smjernicama, pogreška predikcije za pojedinačnu formulaciju do 15 % smatra se prihvatljivom, a ukupna pogreška predikcije ne smije prelaziti 10 % [2, 3]. Pogreška predikcije vršne koncentracije za sve formulacije metaksalona bila je niža od 15 %, što se smatra prihvatljivom pogreškom. Ukupna pogreška predikcije za vršnu koncentraciju bila je 9,06 %, dok je ukupna pogreška predikcije za površinu ispod koncentracijske krivulje iznosila 6,05 % (**tablica 26**). Navedene pogreške u predikciji obaju farmakokinetičkih parametara za

sve ispitane formulacije potvrđuju uspostavu najvišeg stupnja povezanosti *in vitro* i *in vivo* podataka (kategorija A) te točnost predviđanja razvijenoga IVIVC modela.

U slučaju metaksalona, koji karakterizira znatna varijabilnost farmakokinetičkih parametara unutar samog ispitanika, direktna metoda korištenjem jednadžbi ima velike prednosti pred IVIVC metodom utemeljenom na dekonvoluciji/konvoluciji jer izravno povezuje koncentraciju lijeka u plazmi s *in vitro* podatcima i smanjuje broj koraka koji zahtijevaju aproksimaciju. Prednost tog pristupa jest da ne zahtijeva podatke o oralnoj otopini koji su potrebni za dekonvolucijski/konvolucijski pristup, izbjegava se dekonvolucijski korak koji može biti nestabilan te nema potrebe za indirektnom procjenom predviđenih *in vivo* apsorbiranih frakcija lijeka. Premda primijenjena metoda ima nekih nedostataka u usporedbi s IVIVC metodom nelinearnog modela s miješanim efektima [84, 85, 86] koja obuhvaća različite tipove varijabilnosti (formulacija, ispitanik, kombinacija farmaceutskog oblika i ispitanika), dokazano je da se izravna metoda utemeljena na diferencijalnim jednadžbama koju je predložio Buchwald [91] može koristiti kao alternativa za uspostavu kategorije A IVIVC modela za formulacije lijeka s trenutačnim oslobađanjem. Rezultati ovog rada pokazali su da je moguće razviti klinički relevantnu *in vitro* metodu za tablete metaksalona s trenutačnim oslobađanjem, a identificirana se metoda može rabiti u daljnjem razvoju lijeka kao QC *in vitro* metoda.

6. ZAKLJUČAK

Rezultati ispitivanja topljivosti metaksalona u fiziološkom pH području od 1,2 do 7,4 potvrdili su da pH nema značajnog utjecaja na topljivost i da prosječna topljivost metaksalona iznosi 0,39 mg/ml. S obzirom na dozu lijeka od 800 mg i na rezultate topljivosti, metaksalon pripada u BCS kategoriju slabo topljivih djelatnih tvari.

Rezultati ispitivanja topljivosti binarne smjese metaksalona i HPMC-a u omjeru 20:1 i binarne smjese metaksalona i PVP-a u omjeru 20:1 pokazali su da dodatak pomoćnih tvari nema utjecaj na topljivost metaksalona.

Ispitivanjem permeabilnosti na Caco-2 modelu dokazano je da se metaksalon ubraja u visokopermeabilne lijekove i da se najvjerojatnije apsorbira pasivnim transcelularnim putem koji je određen difuzijom i nije supstrat za P-glikoprotein.

Smjese metaksalona i HPMC-a te metaksalona i PVP-a pokazali su slične rezultate permeabilnosti kao čista djetalna tvar, što potvrđuje činjenicu da pomoćne tvari ne utječu na permeabilnost visokopermeabilne djelatne tvari. Metaksalon u svim ispitivanim formulacijama tableta ima visoku permeabilnost i nema značajne razlike u P_{app} između razvojnih formulacija i referentne formulacije Skelaxina®, što upućuje na zaključak da će sve formulacije imati vrlo sličnu permeabilnost u gastrointestinalnom traktu.

Prema dobivenim rezultatima topljivosti i permeabilnosti, metaksalon pripada klasi 2 BCS klasifikacije lijekova (slabo topljiva i dobro permeabilna djelatna tvar) te je dobar kandidat za uspostavu *in vitro – in vivo* korelacije jer je oslobađanje djelatne tvari limitirajući činitelj koji utječe na njegovu apsorpciju.

Inicijalna ispitivanja *in vitro* oslobađanja metaksalona provedena u biorelevantnim medijima pokazala su dosta niske i međusobno slične profile oslobađanja, stoga su razvijene diskriminatorne *in vitro* metode kojima su određeni brzina i intenzitet oslobađanja metaksalona u pH medijima 4,5 i 6,8 uz dodatak NaCl i variranje količina surfaktanta od 0,1 do 0,4 %.

Također je dokazano da USP metoda *in vitro* oslobađanja lijeka nije klinički relevantna za predikciju ponašanja tableta metaksalona *in vivo*.

Studija ispitivanja bioekvivalencije oralne otopine i triju formulacija tableta *in vivo* na zdravim dobrovoljcima potvrdila je da je oslobađanje metaksalona iz tableta ključni činitelj koji limitira njegovu apsorpciju.

Relativna bioraspoloživost tableta metaksalona u usporedbi s oralnom otopinom niska je i ovisi o formulaciji tableta. Najvišu relativnu bioraspoloživost imala je formulacija A, koja je sadržavala HPMC kao vezivo, a iznosila je 33,54 %. Relativna bioraspoloživost Skelaxina® bila je 26,99 %. Najnižu bioraspoloživost pokazala je formulacija B, u kojoj je PVP služio kao vezivo, a iznosila je 15,59 %. Viša bioraspoloživost oralne otopine i formulacije A u odnosu prema referentnoj formulaciji Skelaxina® upućuje na to da se metaksalon može oblikovati tako da se poboljša bioraspoloživost u odnosu na postojeći lijek na tržištu (Skelaxin®) s mogućnošću smanjenja doze / broja dnevnih doza.

Iz krivulje kumulativne količine apsorbiranog lijeka dobivene metodom dekonvolucije, također je potvrđeno da se tablete metaksalona ograničeno otapaju/apsorbiraju u gastrointestinalnom traktu.

Koncentracijske krivulje metaksalona mogu se opisati jednoprostornim farmakokinetičkim modelom.

IVIVC je uspostavljen direktnom metodom utemeljenom na diferencijalnim jednadžbama. Rijetko je korištena u literaturi, premda je metoda izbora za lijekove koji imaju varijabilne farmakokinetičke parametre kao metaksalon. Zbog transparentnosti korištenja prostornog farmakokinetičkog modela koji karakterizira lijek te izravnog povezivanja koncentracije lijeka u plazmi s *in vitro* podatcima, ta metoda ima znatne prednosti pred najčešće upotrebljavanom uspostavom korelacije metodom dekonvolucije/konvolucije. Za uspostavu modela nisu potrebni podatci o oralnoj otopini, a izbjegava se i dekonvolucijski korak koji može biti nestabilan.

Najviši stupanj povezanosti, kategorija A, uspostavljena je između *in vitro* krivulje oslobađanja u acetatnom puferu pH vrijednosti 4,5 uz dodatak 0,5 % NaCl i 0,2 % NaLS *i in vivo* koncentracijskih profila dobivenih bioekvivalencijskim ispitivanjem.

Validacijom modela utvrđena je pogreška predikcije modela koja je bila unutar granica propisanih regulatornim smjernicama, što potvrđuje točnost predviđanja razvijene korelacije.

Premda su regulatorne smjernice i većina primjera u literaturi usmjereni na formulacije s kontroliranim oslobađanja, u ovom je radu uspješno uspostavljena korelacija formulacije s trenutačnim oslobađanjem jer metaksalon prema BCS-u pripada klasi 2: brzina njegove apsorpcije ovisi o brzini oslobađanju lijeka iz tableta.

Identifikacija klinički relevantne metode *in vitro* oslobađanja lijeka omogućuje daljnje optimiziranje formulacije generičkog oblika metaksalona bez nepotrebnih ispitivanja na zdravim dobrovoljcima i skraćuje vrijeme razvoja adekvatne formulacije.

7. LITERATURA

1. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. Pharm Res.1995;12(3):413-420.

2. Guidance for Industry Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation, and Application of In vitro /In vivo Correlations, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 1997; http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm070239.pdf.

3. Guideline on the pharmacokinetic and clinical evaluation of modified release dosage forms (EMA/CPMP/EWP/280/96 Corr1); Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 2014.

4. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System Guidance for Industry, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 2017, https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070246.pdf.

5. GUIDELINE ON THE INVESTIGATION OF BIOEQUIVALENCE (CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1/ Corr **), 2010.

6 Sediq A, Kubbinga M, Langguth P, Dressman J. The impact of the EMA change in definition of "dose" on the BCS dose-solubility ratio: a review of the biowaiver monographs.J Pharm Sci. 2014;103(1):65-70.

7. Rautio J, Kumpulainen H, Heimbach T, Oliyai R, Oh D, Järvinen T, Savolainen J. Prodrugs: design and clinical applications.Nat Rev Drug Discov. 2008;7(3):255-270.

8. Tsume Y, Mudie DM, Langguth P, Amidon GE, Amidon GL. The Biopharmaceutics Classification System: subclasses for in vivo predictive dissolution (IPD) methodology and IVIVC. Eur J Pharm Sci. 2014;57:152-163.

9. Benet LZ. The role of BCS (biopharmaceutics classification system) and BDDCS (biopharmaceutics drug disposition classification system) in drug development. J Pharm Sci. 2013;102(1):34-42.

10. Butler JM, Dressman JB. The developability classification system: application of biopharmaceutics concepts to formulation development. J Pharm Sci. 2010;99(12):4940-5954.

11. Dahan A, Miller JM, Amidon GL. Prediction of solubility and permeability class membership: provisional BCS classification of the world's top oral drugs. AAPS J. 2009;11(4):740-746.

12. Deferme S, Annaert P, Augustijns P. In Vitro Screening Models to Assess Intestinal Drug Absorption and Metabolism. Poglavlje iz knjige Drug Absorption Studies. Biotechnology: Pharmaceutical Aspects, vol VII. Springer, 2008:182-215.

13. van Breemen RB, Li Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2005;1(2):175-185.

14. Gao J, Hugger ED, Beck-Westermeyer MS, Borchardt RT. Estimating intestinal mucosal permeation of compounds using Caco-2 cell monolayers. Curr Protoc Pharmacol. 2001;poglavlje 7:Unit 7.2.

15. Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. Adv Drug Deliv Rev. 2001;46(1-3):27-43.

16. Balimane PV, Han YH, Chong S. Current industrial practices of assessing permeability and P-Glycoprotein Interaction. AAPS J. 2006;8(1):E1-13.

17. Lakshmana Rao A, Sankar GG. Caco-2 cells: an overview. JPRHC. 2009;1(2):260-275.

18. Hermans A, Abend AM, Kesisoglou F, Flanagan T, Cohen MJ, Diaz DA, et al. Approaches for establishing clinically relevant dissolution specifications for immediate release solid oral dosage forms. AAPS J. 2017;19(6):1537-1549.

19. Selen A, Cruañes MT, Müllertz A, et al. Meeting Report: Applied Biopharmaceutics and Quality by Design for Dissolution/Release Specification Setting: Product Quality for Patient Benefit. AAPS J. 2010;12(3):465-472.

20. Dickinson PA, Lee WW, Stott PW, Townsend AI, Smart JP,Ghahramani P, et al. Clinical relevance of dissolution testing in quality by design. AAPS J. 2008;10(2):380-390.

21. Jug M, Hafner A, Lovrić J, Kregar ML, Pepić I, Vanić Ž, Cetina-Čižmek B, Filipović-Grčić J. An overview of in vitro dissolution/release methods for novel mucosal drug delivery systems. J Pharm Biomed Anal. 2018;147:350-366.

22. Siepmann J, Siepmann F. Mathematical modeling of drug dissolution. Int. J. Pharm. 2013;453(1):12-24.

23. Dressman JB, Reppas C. In vitro - in vivo correlations for lipophylic, poorly water-soluble drugs. Eur J Pharm Sci. 2000;11 Suppl 2:S73-80.

24. USP, 2015c. <711> Dissolution, u: USP 38/NF 33, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, SAD, 486-496.

25. Shargel L, Yu A. Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics, fourts edition, McGraw-Hill, Medical Pub. Division, New York (2005).

26. Gray V, Kelly G, Xia M, Butler C, Thomas S, Mayock S.The science of USP 1 and 2 Dissolution: present challenges and future relevance. Pharm Res. 2009;26(6):1289-1302.

27. Long M, Chen Y, Dissolution testing of solid products, poglavlje 14, Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice; 2nd edition, Academic Press, 2016.

28. Grady H, Elder D, Webster GK, et al. Industry's View on Using Quality Control, Biorelevant, and Clinically Relevant Dissolution Tests for Pharmaceutical Development, Registration, and Commercialization. J Pharm Sci. 2018;107(1):34-41.

29. Klein S. The use of biorelevant dissolution media to forecast the *in vivo* performance of a drug. AAPS J. 2010;12(3):397-406.

30. Hörter D, Dressman JB. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. Adv Drug Deliv Rev. 2001;46(1-3):75-87.

31. Marroum PJ. Clinically relevant dissolution methods and specifications. Am Pharm Rev. 2012;15(1):36-41.

32. Vertzoni M, Dressman J, Butler J, Hempenstall J, Reppas C. Simulation of fasting gastric conditions and its importance for the in vivo dissolution of lipophilic compounds. Eur J Pharm Biopharm. 2005;60(3):413-417.

33. Jantratid E, Janssen N, Reppas C, Dressman JB. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update. Pharm Res. 2008;25(7):1663-1676.

34. Reppas C, Friedel HD, Barker AR, et al. Biorelevant in vitro performance testing of orally administered dosage forms-workshop report. Pharm Res. 2014;31(7):1867-1876.

35. Costa P, Sousa Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. Eur. J.Pharm. Sci. 2001;13(2):123-133

36. El-Kattan A,Varma M. Oral Absorption, Intestinal Metabolism and Human Oral Bioavailability, Topics on Drug Metabolism, 2012, Available from: http://www.intechopen.com/books/topics-on-drug-metabolism/oral-absorption intestinalmetabolism- and-human-oral-bioavailability

37. Yu LX, Lipka E, Crison JR, Amidon GL. Transport approaches to the biopharmaceutical design of oral drug delivery systems: prediction of intestinal absorption.Adv Drug Deliv Rev. 1996;19(3):359-376.

38. Agoram B, Woltosz WS, Bolger MB. Predicting the impact of physiological and biochemical processes on oral drug bioavailability. Adv Drug Deliv Rev. 2001;50 Suppl 1:S41-S67.

39. Hämäläinen MD, Frostell-Karlsson A. Predicting the intestinal absorption potential of hits and leads.Drug Discov Today Technol. 2004;1(4):397-405.

40. Lande MB, Priver NA, Zeidel ML. Determinants of apical membrane permeabilities of barrier epithelia. Am J Physiol. 1994;267(2 Pt 1):C367-74.

41. Tsuji A, Tamai I. Carrier-mediated intestinal transport of drugs. Pharm Res. 1996;13(7):963-77.

42. Nellans HN. Mechanisms of peptide and protein absorption: (1) Paracellular intestinal transport: modulation of absorption. Adv Drug Del Rev.1991;7(3):339-364

43. Steffansen B, Nielsen CU, Brodin B, Eriksson AH, Andersen R, Frokjaer S. Intestinal solute carriers: an overview of trends and strategies for improving oral drug absorption. Eur J Pharm Sci. 2004;21(1):3-16.

44. Dressman JB, Reppas C: Oral drug absorption: prediction and assessment, second edition. 2010. CRC Press.

45. Mudie DM, Amidon GL, Amidon GE. Physiological parameters for oral delivery and in vitro testing. Mol Pharm. 2010;7(5):1388-1405.

46. Lartigue S, Bizais Y, Des Varannes SB, Murat A, Pouliquen B, Galmiche JP. Inter- and intrasubject variability of solid and liquid gastric emptying parameters. A scintigraphic study in healthy subjects and diabetic patients. Dig Dis Sci 1994;39:109-115.

47. Helander HF, Fändriks L. Surface area of the digestive tract - revisited. Scand J Gastroenterol. 2014;49(6):681-9.

48. Dahan AS,Amidon GL. Gastrointestinal dissolution and absorption of class II drugs. Poglavlje 3. iz knjige Drug Bioavailability: Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability, Volume 40, drugo izdanje, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009; 33-51.

49. Schmidt HA, Fritzlar G, Dolle W, Goebell H. Comparative studies on the histamine and insulin stimulated acid pepsin secretion in patients suffering from ulcus duodeni and control persons. Dtsch Med Wochenschr. 1970;95(40):2011-2016.

50. Lambert R, Martin F, Vagne M. Relationship between hydrogen ion and pepsin concentration in human gastric secretion. Digestion. 1968;1(2):65-77.

51. Strocchi A, Levitt MD. Role of villous surface area in absorption. Science versus religion. Dig Dis Sci.1993;38(3):385-387.

52. Lennernäs H, Palm K, Fagerholm U, Artursson P. Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells in vitro and human jejunum in vivo. Int J Pharm. 1996;127(1):103-107.

53. Lennernäs H. Human intestinal permeability. J Pharm Sci. 1998;87(4):403-410.

54. Porter CCJH, Charman WN. Lipid-Based Formulations for Oral Administration: Opportunities for Bioavailability Enhancement and Lipoprotein Targeting of Lipophilic Drugs, poglavlje 4 iz knjige Drug Targeting Technology: Physical Chemical Biological MethodsSchreirer H. Drug targeting technology. Marcel Dekker Inc; 2001:102.

55. Fagerholm U, Lennernäs H. Experimental estimation of the effective unstirred water layer thickness in the human jejunum, and its importance in oral drug absorption. Eur J Pharm Sci. 1995;3(5):247-253.

56. Hurst S, Loi CM, Brodfuehrer J, El-Kattan A. Impact of physiological, physicochemical and biopharmaceutical factors in absorption and metabolism mechanisms on the drug oral bioavailability of rats and humans. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2007;3(4):469-489.
57. Anderson BW, Levine AS, Lewitt DG, Kneip JM, Lewitt MD. Physiological measurement of luminal stirring in perfused rat jejunum. Am J Physiol. 1988;254(6 Pt 1):G843-848.
58. Levitt MD, Furne JK, Strocchi A, Anderson BW, Levitt DG. Physiological measurements of luminal stirring in the dog and human small bowel. J Clin Invest. 1990;86(5):1540-1547.
59. Ozturk SS, Palsson BO, Dressman. Dissolution of ionizable drugs in buffered and unbuffered solutions. Pharm. Res. 1988;5(5): 272-282.
60. Lim CL, Byrne C, Lee JK. Human thermoregulation and measurement of body temperature in exercise and clinical settings. Ann Acad Med Singapore. 2008;37(4):347-353.
61. Chawla G, Gupta P, Koradia V, Bansal AK. Gastroretention. A means to address regional variability in intestinal drug absorption. Pharmaceutical tech. 2003;27(7):50-68.
62. Hörter D, Dressman JB. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. Adv Drug Deliv Rev. 2001;46(1-3):75-87.
63. Lentz KA. Current methods for predicting human food effect. AAPS J. 2008;10(2):282-828.
64. Grignard E, Taylor R, McAllister M, et al. Considerations for the development of in vitro dissolution tests to reduce or replace preclinical oral absorption studies. Eu J Pharm Sci. 2017;(99):193-201.
65. Diakidou A, Vertzoni M, Goumas K, Söderlind E, Abrahamsson B, Dressman J, Reppas C. Characterization of the contents of ascending colon to which drugs are exposed after oraladministration to healthy adults. Pharm Res. 2009;26(9):2141-2151.
66. Basit WA, McConnel EL. Controlled release in oral drug delivery. poglavlje 18; Springer 2011.
67. Martinez MN, Amidon GL. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. J Clin Pharmacol. 2002;42(6):620-643.
68. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Adv Drug Deliv Rev. 2001;46(1-3):3-26.

69. Song NN, Zhang SY, Liu CX. Overview of factors affecting oral drug absorption. Asian J Drug Metab Pharmacokinet. 2004;4(3):167-176.

70. Delaney JS. ESOL:estimating aqueous solubility directly from molecular structure. J Chem Inf Comput Sci. 2004;44(3):1000-1005.

71. Coupe AJ, Davis SS, Wilding IR. Variation in Gastrointestinal Transit of Pharmaceutical Dosage Forms in Healthy-Subjects. Pharm Res. 1991;8:360–364.

72. Gupta S, Kesarla R, Omri A. Formulation strategies to improve the bioavailability of poorly absorbed drugs with special emphasis on self-emulsifying systems. ISRN Pharm. 2013;2013:848043.

73. Jackson K, Young D, Pant S.Drug-excipient interaction and their effeect on absorption. Pharm Sci Technolo Today. 2000;3(10):336-345.

74. Garcia-Arietta A. Interactions between active pharmaceutical ingredients and excipients affecting bioavailability: impact on bioequivalence. Eur J Pharm Sci. 2014;65:89-97.

75. Löbenberg R, Amidon GL. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. Eur J Pharm Biopharm. 2000;50(1):3-12.

76. Emami J. *In vitro- in vivo* Correlation: from theory to applications, J Pharm Pharm Sci. 2006;9(2):169-189.

77. Margolskee A, Darwich AS, Galetin A, Amin Rostami-Hodjegan A, Aarons L. Deconvolution and IVIVC: Exploring the Role of Rate-Limiting Conditions. AAPS J. 2016 ; 18(2): 321–332.

78 . Ilić M, Kovačević I, Parojčić J. Deciphering nifedipine in vivo delivery from modified release dosage forms: Identification of food effect. Acta Pharm. 2015;65(4):427-41.

79. Cardot JM, Davit BM. In vitro – in vivo correlations: trick and traps. AAPS J. 2012;14(3):491-499.

80. Yáñez JA, Remsberg CM, Sayre CL, Forrest ML, Davies NM. Flip-flop pharmacokinetics--delivering a reversal of disposition: challenges and opportunities during drug development. Ther Deliv. 2011;2(5):643-672.

81. Gillespie WR. Convolution-based approaches for *in Vivo-in Vitro* correlation modeling. Adv Exp Med Bio. 1997;423:53-65

82. Qui Y, Duan JZ. In vitro/In vivo correlation: Fundamentals, Development Coonsideration, and Application (poglavlje 16.) iz knjige Developing solid oral dosage forms, Pharmaceutical Theory & Practice, second edition, Elsevier, 20017.

83. O'Hara T, Hayes S, Davis J, Devane J, Smart T, Dunne A. *In vivo –in vitro correlation* (IVIVC) modeling incorporating a convolution step. J Pharmacokinet Pharmacodyn. 2001; 28(3):277–298.

84. Rossenu S, Gaynor C, Vermeulen A, Cleton A, Dunne A. A nonlinear mixed effects IVIVC model for multi-release drug delivery systems. J Pharmacokinet Pharmacodyn. 2008;35(4):423-441.

85. Costello C, Rossenu S, Vermeulen A, Cleton A, Dunne A. A time scaling approach to develop an *in vitro-in vivo* correlation (IVIVC) model using a convolution-based technique. J Pharmacokinet Pharmacodyn. 2011;38(5):519-539.

86. Jacobs T, Rossenu S, Dunne A, Molenberghs G,.Straetemans R, Bijnens L. Combined models for data from *in vitro-in vivo* correlation experiments. J Biopharm Stat. 2008;18(6):1197-1211.

87. Gaynor C, Dunne A, Davis J. A comparison of the prediction accuracy of two IVIVC modelling techniques.J Pharm Sci. 2008;97(8):3422-3432.

88. Beal SL, Sheiner LB (eds) (1989–1998) NONMEM users guides I-VIII. Globomax, Hanover

89. GastroPlusTM User Manual version 9.5. Simulations Plus, Inc., Lancaster, CA, USA,March 2017.

90. Lukacova V, Woltosz WS, Bolger MB. Prediction of modified release pharmacokinetics and pharmacodynamics from in vitro, immediate release, and intravenous data. AAPS J. 2009;11(2):323–334.

91. Buchwald P. Direct, differential-equation – based in vitro – in vivo correlation (IVIVC) method. J Pharm Pharmacol. 2003;55(4):495-504.

92. Chaturvedula A, Goti V, Wilensky SB, Walsh BG. Development of a Direct Differential Equation Based IVIVC for Paracetamol Immediate Release Formulations, http://abstracts.aaps.org/Verify/aaps2013/postersubmissions/R6050

93. Khan MZI, Dissolution testing for sustained or controlled release oral dosage forms and correlation with in vivo data: Challenges and opportunities, Int J Pharm. 1996;140(2):131–143.

94. Skelly JP, Amidon GL, Barr WH, Benet LZ, Carter JE, Robinson JR, Shah VP, Yacobi A. In vitro and in vivo testing and correlation for oral controlled/modified-release dosage forms, Pharm Res. 1990;7(9):975–982.

95. Mauger DT, Chinchilli VM. In vitro - in vivo relationships for oral extended-release drug products. J Biopharm Stat. 1997;7(4):565–578.

96. Kakhi M, Marroum P, Chittenden J. Analysis of level A in vitro –in vivo correlations for an extended-release formulation with limited bioavailability. Biopharm Drug Dispos. 2013;34(5):262-277.

97. Li S, He H, Parthiban LJ, Yin H, Serajuddin AT. IV-IVC considerations in the development of immediate-release oral dosage form. J Pharm Sci. 2005;94(7):1396-1417.

98. Bredael GM, Bowers N, Boulineau F, Hahn D. *In vitro – in vivo* correlation strategy applied to an immediate-release solid oral dosage form with a Biopharmaceutical Classification System IV compound case study. J Pharm Sci. 2014;103(7):2125-2130.

99. Honorio Tda S, Pinto EC, Rocha HV, Esteves VS, dos Santos TC, Castro HC, Rodrigues CR, de Sousa VP, Cabral LM. *In vitro – in vivo* correlation of efavirenz tablets using GastroPlus®. AAPS PharmSciTech. 2013;14(3):1244-1254.

100. Saibi Y, Sato H, Tachiki H. Developing *in vitro – in vivo* correlation of risperidone immediate release tablet. AAPS PharmSciTech. 2012;13(3):890-895.

101. Kesisoglou F, Hermans A, Neu C, Yee KL, Palcza J, Miller J. Development of In vitro–In vivo Correlation for Amorphous Solid Dispersion Immediate-Release Suvorexant Tablets and Application to Clinically Relevant Dissolution Specifications and In-Process Controls. J Pharm Sci. 2015;104(9):2913–2922.

102. Raušl D, Fotaki N, Zanoški R, Vertzoni M, Cetina-Cizmek B, Khan MZI, Reppas C.Intestinal permeability and excretion into bile control the arrival of amlodipine into systemic circulation after oral administration. J. Pharm. Pharmacol. 2006;58(6):827-836.

103. Khan MZI, Rausl D, Zanoski R , Zidar S, Mikulcić JH, Krizmanić L, Eškinja M, Mildner B , Knezević Z. Classification of loratadine based on the biopharmaceutics drug classification concept and possible in vitro-in vivo correlation. Biol Pharm Bull. 2004; 27(10):1630-1635.

104. Skelaxin Monograph. Dostupna na https://www.rxlist.com/skelaxin-drug.htm, pristupljeno:listopad 2017.

105. https://www.fda.gov/ohrms/dockets/dailys/01/May01/051401/let0001.pdf pristupljeno: listopad 2017.

106.http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm088669.pdf, pristupljeno: listopad 2017.

107. Metaxalone tablets, USP monograph, in: United States Pharmacop. USP 40/NF 35, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, USA, 2017: pp. 5046–5047.

108. http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/04p0140/04p-0140-sup0004-01-vol5.pdf, pristupljeno: listopad 2017.

109. Cacace J, Reilly EE, Amann A. Comparison of the dissolution of metaxalone tablets (Skelaxin) using USP Apparatus 2 and 3. AAAPS PharmSciTech. 2004;5(1):E6.

110. Phoenix WinNonLin version 6.4 User's guide

111. Wolfram Research, Inc., Mathematica, Version 11.1, Champaign, IL (2017).

112. Vuletić L, Khan MZI, Špoljarić D, Radić M, Cetina-Čižmek B, Filipović-Grčić J. Development of a Clinically Relevant Dissolution Method for Metaxalone Immediate Release Formulations Based on an IVIVC Model.Pharm Res. 2018 ;35(8):163.

113. Shah VP, Konecny JJ, Everett RL, McCullough B, Noorizadeh AC, Skelly JP. *In vitro* dissolution profile of water-insoluble drug dosage forms in the presence of surfactants. Pharm Res. 1989;6(7):612-618.

114. Brockmeier D, Dengler HJ,Voegele D. In vitro-in vivo correlation of dissolution, a time scaling problem? Transformation of in vitro results to the in vivo situation, using theophylline as a practical example. Eur J Clin Pharmacol. 1985;28(3):291-300.

ŽIVOTOPIS

Lucija Vuletić (djevojačko prezime Žuvela)

Osobni podaci
Datum i mjesto rođenja: 18. ožujka 1978. g. u Dubrovniku
Državljanstvo: Republike Hrvatske

Školovanje
Od 2007. g. Poslijediplomski doktorski studij, Farmaceutsko-biokemijski fakultet u Zagrebu
1996. – 2001. g. Farmaceutsko-biokemijski fakultet u Zagrebu, studij Farmacija

Radno iskustvo
Od 2012. g. Menadžer kliničkog razvoja generičkih lijekova
PLIVA Hrvatska d.o.o., Istraživanje i razvoj, Klinički razvoj

Od 2007 - 2012. g. Koordinator kliničkog razvoja generičkih lijekova
PLIVA Hrvatska d.o.o., Istraživanje i razvoj, Klinički razvoj

2006. – 2007. g. Suradnik kliničkog razvoja generičkih lijekova
PLIVA Hrvatska d.o.o., Istraživanje i razvoj, Klinički razvoj

2003. – 2006. g. Analitičar
PLIVA Hrvatska d.o.o., Razvoj poslovanja generika, Podrška upravljanju portfeljem

2001. – 2002. g. Pripravnik
Zdravstvena ustanova ″Ljekarne Dubrovnik″

Znanstveni radovi
1) **Vuletić L**, Herceg M, Ferderber K, Tunjić I, Rizea-Savu S, Duna SN, Cetina-Čižmek B, Filipović-Grčić J. Single-dose pharmacokinetic properties and relative bioavailability of different formulations of posaconazole oral suspension in healthy volunteers. Clin Pharmacol Drug Dev. 2018 Dec 10. doi: 10.1002/cpdd.636.

2) **Vuletić L**, Khan MZI, Špoljarić D, Radić M, Cetina-Čižmek B, Filipović-Grčić J. Development of a Clinically Relevant Dissolution Method for Metaxalone Immediate Release Formulations Based on an IVIVC Model. Pharm Res. 2018;35(8):163.

Predavanja
1) **Vuletić L**. *In vitro-in vivo* korelacija lijeka s produljenim oslobađanjem, Farmaceutsko – biokemijski fakultet, simpozij studenata FBF, 2012.
2) **Vuletić L**. Izazovi u bioekvivalencijskim studijama, Hrvatsko farmaceutsko društvo, 2009.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za farmaceutsku tehnologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Doktorski rad

RAZVOJ BIORELEVANTNE METODE ISPITIVANJA *IN VITRO* OSLOBAĐANJA METAKSALONA IZ TABLETA TRENUTNOG OSLOBAĐANJA

Lucija Vuletić

SAŽETAK

Vrlo važan korak tijekom razvoja novog lijeka jest kreiranje klinički relevantne *in vitro* metode oslobađanja lijeka. Tijekom razvoja lijeka studije bioraspoloživosti lijeka *in vivo* mogu zamijeniti ispitivanjem oslobađanja lijeka *in vitro* ako je uspostavljen matematički model koji opisuje odnos između profila oslobađanja lijeka *in vitro* i odgovora *in vivo* (koncentracija lijeka u plazmi ili frakcija apsorbiranog lijeka) koji se naziva *in vitro – in vivo* korelacija (IVIVC).

Cilj je ovog rada klasificirati metaksalon prema biofarmaceutskoj klasifikaciji lijekova (BCS), razviti klinički relevantnu *in vitro* metodu oslobađanja lijeka i uspostaviti IVIVC model.

Topljivost lijeka ispitivana je pri različitim pH vrijednostima medija, a permeabilnost je provedena na Caco-2 staničnome modelu. Testovi oslobađanja *in vitro* provedeni su s trima različitim formulacijama tableta s trenutačnim oslobađanjem metaksalona uz primjenu aparature tipa 2. Iste su formulacije tableta i oralna otopina metaksalona korištene u bioekvivalencijskoj studiji *in vivo* na zdravim ispitanicima u randomiziranom, ukriženom pokusu. IVIVC je uspostavljen metodom utemeljenom na diferencijalnim jednadžbama.

Dobiveni su rezultati potvrdili da metaksalon prema klasifikaciji lijekova BSC pripada klasi 2. Provedena bioekvivalencijska studija potvrdila je da je oslobađanje lijeka ključan korak koji utječe na bioraspoloživost i jedna je ispitivana formulacija tableta imala značajno veću bioraspoloživost od referentne formulacije. Najviši stupanj korelacije postignut je primjenom metode s acetatnim puferom pH 4,5 uz dodatak 0,5 % natrijeva klorida i 0,2 % natrijeva laurilsulfata (USP aparatura 2, 50 okr./min) kao medijem za oslobađanje lijeka *in vitro*. Validacijom modela utvrđena je njegova prihvatljiva pogreška, čime je potvrđena točnost predviđanja razvijenoga IVIVC modela.

Ta spoznaja omogućuje optimizaciju formulacija tableta metaksalona i izbjegavanje nepotrebnih ispitivanja neadekvatnih formulacija na zdravim dobrovoljcima. Identificirani *in vitro* medij može poslužiti za razvoj generičkog lijeka drugih molekula sličnih fizikalno-kemijskih svojstava. U ovom je radu IVIVC model uspostavljen izravnom metodom utemeljenom na diferencijalnim jednadžbama, koji se može primijeniti kao alternativni model za uspostavu IVIVC-a lijekova BCS klase 2 s trenutačnim oslobađanjem.

Rad je pohranjen u Centralnoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži: 119 stranica, 23 slike, 26 tablica, 114 literaturnih navoda, izvornik je na hrvatskom jeziku

Ključne riječi: metaksalon, topljivost, apsorpcija na Caco-2 staničnom modelu, klinički relevantna *in vitro* metoda oslobađanja lijeka, *in vitro-in vivo* korelacija bazirana na diferencijalnom jednadžbama

Mentori: **Dr. sc. Biserka Cetina-Čižmek i prof. dr. sc. Jelena Filipović-Grčić**

Ocjenjivači: **izv. prof. dr. sc. Jasmina Lovrić**, *Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*

nasl.doc.dr.sc. Mila Lovrić, *KBC Zagreb*

Dr. sc. Maja Lusina Kregar, *HALMED*

Rad prihvaćen: 12. lipnja 2019.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Pharmaceutical Technology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Doctoral dissertation

BIORELEVANT DISSOLUTION METHOD DEVELOPMENT FOR METAXALONE IMMEDIATE RELEASE TABLETS

Lucija Vuletić

SUMMARY

An important step during drug development process is design of a clinically relevant *in vitro* drug release dissolution method. *In vitro* testing may serve as a surrogate for *in vivo* bioavailability study if *in vitro-in vivo correlation* (IVIVC), a predictive mathematical model describing the relationship between an *in vitro* property of a dosage form and relevant *in vivo* response (plasma drug concentration or fraction of the absorbed drug) is established.

The aim of the present work was to classify metaxalone according to the Biopharmaceutics Classification System (BCS), to develop a clinically relevant dissolution method that can be used to predict the oral absorption of metaxalone and to establish an *in vitro-in vivo* correlation (IVIVC).

Solubility of the drug was studied in different pH media and permeability studies were performed using a Caco-2 cell model. The *in vitro* dissolution and *in vivo* disposition of metaxalone from 3 different immediate release (IR) tablet formulations were investigated using USP 2 apparatus and a single dose, four-way, crossover bioequivalence study in healthy humans along with an oral solution of the drug, respectively. An IVIVC was established by using a direct, differential based method.

Metaxalone has been confirmed as a Class 2 drug according to BCS. Bioavailability studies performed in humans demonstrated that dissolution was the rate limiting step for bioavailability of the drug and one of the test products had significantly improved bioavailability compared to the marketed product. A highest level of correlation with *in vivo* data was established with the *in vitro* data obtained in pH 4.5 dissolution medium containing 0.5% NaCl with 0.2% SLS (USP apparatus 2 at 50 rpm). An IVIVC model validation was performed and demonstrated an acceptable internal predictability.

Based on these findings, it is possible to further optimize the development of metaxalone tablets and to avoid unnecessary testing of inadequate formulations on healthy volunteers, the identified *in vitro* medium can serve in the generic development of other molecules of similar physical-chemical characteristics. In this work the IVIVC model based on the direct differential equation method can be used as an alternative IVIVC model for BCS class 2 drugs with immediate release.

The dissertation is deposited in the Central Library of Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Dissertation includes: 119 pages, 23 figures, 26 tables, 114 references, original is in Croatian language

Keywords: metaxalone, solubility, Caco-2 cell absorption, clinically relevant dissolution method, direct differential equation based *in vitro-in vivo* correlation

Menthors: **Biserka Cetina-Čižmek, Ph.D. and Prof. Jelena Filipović-Grčić, Ph.D.**

Reviewers: **Jasmina Lovrić, Ph.D.,** *Associate Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb*

Mila Lovrić, Ph.D., *KBC Zagreb*

Maja Lusina Kregar, Ph.D., *HALMED*

Dissertation accepted: June, 12th, 2019.