Mehanokemijska priprava i karakterizacija polimernih disperzija i kokristala prazikvantela

Cugovčan, Martina

Doctoral thesis / Disertacija

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:429428

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Martina Cugovčan

MECHANOCHEMICAL PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF POLYMERIC DISPERSIONS AND COCRYSTALS OF PRAZIQUANTEL

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2019

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Martina Cugovčan

MEHANOKEMIJSKA PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA POLIMERNIH DISPERZIJA I KOKRISTALA PRAZIKVANTELA

DOKTORSKI RAD

Mentori:
prof. dr. sc. Nives Galić
izv. prof. dr. sc. Mario Jug

Zagreb, 2019.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Martina Cugovčan

MECHANOCHEMICAL PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF POLYMERIC DISPERSIONS AND COCRYSTALS OF PRAZIQUANTEL

DOCTORAL THESIS

Supervisors:
Prof. Nives Galić
Assoc. Prof. Mario Jug

Zagreb, 2019

ZAHVALE

Na početku ovog rada želim zahvaliti svima koji su bili uz mene, doprinjeli njegovom stvaranju te mi nesebično pomagali da i ovu stepenicu u svom životu uspješno prođem. Prvenstveno želim zahvaliti svojim mentorima prof. dr. sc. Nives Galić i izv. prof. dr. sc. Mariju Jugu, na znanstvenom i stručnom nesebičnom pomaganju, podršci, poticanju, na svim savjetima, usmjeravanju i vođenju kroz izradu ovog rada. Bila mi je čast što sam učila od Vas.

Veliko hvala mojim roditeljima i sestri koji su strpljivo čekali kraj ovog razdoblja mog života. Hvala Vam što ste mi pružali podršku, vjerovali u mene i motivirali me kada mi je bilo najteže. Hvala Vam što nikada niste gubili nadu i ponekad bili ustrajniji od mene i niste mi dozvolili da posustanem. Zahvaljujem Vam na strpljenju i ogromnoj količini ljubavi. Bez Vas nebi bilo ni ovog rada.

Hvala mom suprugu i kćeri. Uz veliko strpljenje i razumijevanje stajao si uz mene i hrabrio me da i ovaj pothvat privedem kraju. Kada nisam znala kako dalje pronašao si načina da popraviš moje raspoloženje i daš mi snage za nastavak rada.

Zahvaljujem svima iz mog poslovnog okruženja, koji su prepoznali stjecanje znanja kao resurs za budućnost i omogućili mi korištenje laboratorija i ostalih resursa, za pohađanje i završetak studija.

Posebno hvala mojoj Vedrani. Oprosti na tolikim pozivima u pomoć i pokojoj suzi. Naučila si me prepoznati životne vrijednosti, ono što prije nisam uviđala. Uvijek si znala što reći i kako me ohrabriti. Hvala Ti na konstantnoj podršci. Imati prijatelja poput Tebe pravo je bogatstvo.

Hvala svima, rodbini i prijateljima, koji nisu poimence spomenuti, a koji su bili uz mene makar u mislima i vjerovali u ispunjenje mog konačnog cilja.

Sadržaj

SAŽETAK ..... **VII**
ABSTRACT ..... **VIII**
§ 1. UVOD **1**
§ 2. LITERATURNI PREGLED **4**
2.1. Shistosomijaza (bilharcija) **4**
2.2. Prazikvantel **6**
2.2.1. Kemijska svojstva prazikvantela 6
2.2.2. Doziranje i učinkovitost prazikvantela 8
2.2.3. Farmakodinamička svojstva PZQ 9
2.2.4. Farmakokinetička svojstva PZQ 10
2.2.5. Ostala područja primjene PZQ 11
2.3. Postupci povećanja topljivosti teško topljivih lijekova **12**
2.3.1. Primjena čvrstih disperzija u povećanju topljivosti lijeka 13
2.3.2. Priprema čvrstih disperzija 13
2.3.3. Primjena čvrstih disperzija u povećanju topljivosti PZQ 16
2.4. Ciklodekstrini **18**
2.4.1. Struktura i derivati ciklodekstrina 18
2.4.2. Mehanizam nastanka inkluzijskih kompleksa 22
2.4.3. Metode pripreme inkluzijskih kompleksa u čvrstom stanju 24
2.4.4. Primjena CD u povećanju topljivosti PZQ 25
2.5. Kokristali djelatnih tvari **26**
2.5.1. Načini pripreme kokristala 27
2.5.2. Kokristali s PZQ 28
2.6. Mljevenje kao ekološki prihvatljiva metoda sinteze čvrstih disperzija, inkluzijskih kompleksa i kokristala **29**
2.6.1. Mljevenje uz dodatak otapala (LAG) 31
2.7. Mehanokemijska sinteza primjenom vibracijskog mlina **32**
3. EKSPERIMENTALNI DIO **34**
3.1. Materijali **34**
3.2. Priprema binarnih i ternarnih mljevenih uzoraka PZQ-a **35**
3.3. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC) **35**
3.4. Rentgenska difrakcija praškastog uzorka (XRPD) **36**

3.5. Infracrvena spektroskopija (FTIR) **36**
3.6. Ispitivanje topljivosti **36**
3.7. *In vitro* oslobađanje lijeka **37**
3.8. Ispitivanje kemijske stabilnosti **38**
3.9. Uvjeti uzgoja stanica **38**
3.9.1. Ispitivanje citotoksičnosti na kulturi Caco-2 stanica 39
3.9.2. Ispitivanje permeabilnost na Caco-2 staničnom monosloju 40
3.10. HPLC analiza prazikvantela **41**
3.11. Statistička analiza **41**
4. REZULTATI I RASPRAVA **42**
4.1. Utjecaj mljevenja na fizikalno-kemijske karakteristike lijeka **42**
4.2. Polimerne disperzije **46**
4.3. Kokristali **53**
4.4. Inkluzijski kompleksi s ciklodekstrinima **63**
4.5. *In vitro* ispitivanje oslobađanja prazikvantela **68**
4.6. Kemijska stabilnosti odabranih produkata **72**
4.7. Biokompatibilnost i *in vitro* studije permeabilnosti **75**
5. ZAKLJUČAK **81**
6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA **83**
7. LITERATURNI IZVORI **85**
8. ŽIVOTOPIS **98**

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

MEHANOKEMIJSKA PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA POLIMERNIH DISPERZIJA I KOKRISTALA PRAZIKVANTELA

Martina Cugovčan
Genera d.d., Kalinovica, Svetonedeljska cesta 2, 10436 Rakov Potok, Hrvatska

Mehanokemijska aktivacija mljevenjem uz dodatak različitih aditiva korištena je s ciljem poboljšanja nepovoljnih fizičkokemijskih i biofarmaceutskih svojstava prazikvantela (PZQ). Mljevenjem PZQ s limunskom (CA), jabučnom (MA), salicilnom (SA) i vinskom kiselinom (TA) pripravljeni su kokristali za koje je ustanovljeno da topljivost i brzina otapanja ovisi o pH. Najtopljiviji kokristal PZQ s MA kemijski je nestabilan. Najveće povećanje topljivosti i brzine otapanja uočeno je za ekvimolarne komplekse prazikvantela s amorfnim hidroksipropil-β-ciklodekstrinom (HPβCD) i nasumično metiliranim β-ciklodekstrinom (MβCD), ali je jedino produkt PZQ/HPβCD pokazao prihvatljivu kemijsku stabilnost i fotostabilnost. Mljevenjem lijeka s MA i HPβCD u ekvimolarnim količinama također su pripravljeni topljivi amorfni produkti koji su bili kemijski nestabilni, a time neprikladni za farmaceutsku primjenu. Ispitivanja na Caco-2 monosloju potvrdila su biokompatibilnost kompleksa PZQ/HPβCD te da kompleksiranje nije utjecalo na intrinsičnu permeabilnost prazikvantela $Papp$(PZQ)=(3,72±0,33)10^{-5} cm s^{-1} i $Papp$(PZQ/HPβCD)=(3,65±0,21)10^{-5} cm s^{-1}; p>0,05).

(98 stranica, 47 slika, 7 tablica, 141 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi*: in vitro* permeabilnost/ kemijska stabilnost/ kompleksi ciklodekstrina/ otapanje

Mentori: prof. dr. sc. Nives Galić i izv. prof. dr. sc. Mario Jug

Rad prihvaćen: 13. studenog 2019.

Ocjenitelji:
1. izv. prof. dr. sc. Dominik Cinčić
2. prof. dr. sc. Nives Galić
3. doc. dr. sc. Jasna Jablan

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

MECHANOCHEMICAL PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF POLYMERIC DISPERSIONS AND COCRYSTALS OF PRAZIQUANTEL

Martina Cugovčan
Genera Inc., Kalinovica, Svetonedeljska cesta 2, 10436 Rakov Potok, Croatia

Mechanochemical activation using different co-grinding additives was applied to improve physiochemical and biopharmaceutical properties of praziquantel (PZQ). Liquid assisted grinding with citric (CA), malic (MA), salicylic (SA) and tartaric acid (TA) gained in cocrystal formation, which all showed pH-dependent solubility and dissolution rate. The most soluble cocrystal of PZQ with MA was chemically unstable, as seen during the stability testing. Equimolar praziquantel complexes with amorphous hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPβCD) and randomly methylated β-cyclodextrin (MβCD) showed the highest improvement in drug solubility and the dissolution rate, but only PZQ/HPβCD product presented an acceptable chemical and photostability profile. Co-grinding the drug with both MA and HPβCD in equimolar ratio, also gave highly soluble amorphous product which was chemical instable and therefore not suitable for the pharmaceutical use. Studies on Caco-2 monolayer confirmed the biocompatibility of PZQ/HPβCD complex and showed that complexation did not adversely affect the intrinsically high PZQ permeability P_{app}(PZQ)=(3.72±0.33)×10^{-5} cm s^{-1} and P_{app}(PZQ/HPβCD)=(3.65±0.21)×10^{-5} cm s^{-1}; p>0.05).

(98 pages, 47 figures, 7 tables, 141 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: cyclodextrin complexes/ chemical stability/ dissolution/ *in vitro* permeability

Supervisors: Professor Nives Galić and Associate Professor Mario Jug

Thesis accepted: 13th November 2019.

Reviewers:

1. Dr. Dominik Cinčić, Associate Professor
2. Dr. Nives Galić, Full Professor
3. Dr. Jasna Jablan, Assistant Professor

§ 1. UVOD

Prazikvantel (PZQ) je antihelmintik širokog spektra djelovanja koji djeluje cestocidno protiv zrelih i nezrelih stadija trakavica, a pokazuje učinkovitost i protiv metilja. Lijek je izbora za liječenje shistomoniaze (bilharcije) od koje danas boluje oko 200 milijuna osoba u tropskim zemljama Afrike i Azije.[1] PZQ je siguran za primjenu i pokazuje prihvatljiv terapijski profil, a osim u humanoj, koristi se i u veterinarskoj medicini. PZQ se primjenjuje kao racemična smjesa te do sada nije razvijen stereospecifični postupak sinteze, iako je samo (-)-enantiomer eutomer, tj. pokazuje veću učinkovitost uz manje nuspojava, dok se primjena (+)-enantiomera povezuje s nuspojavama i izrazito gorkim okusom lijeka.[2,3] Novija predklinička ispitivanja pokazuju da PZQ sinergistički pojačava antiproliferativni učinak paklitaksela[4] i da učinkovito inhibira P-glikoprotein, čija je aktivnost između ostalog povezana s razvojem rezistencije tumora na citostatike[5] te se može očekivati i proširenje terapijskih indikacija lijeka. Nakon oralne primjene PZQ podliježe metaboličkoj razgradnji tijekom prvog prolaska kroz jetru, a bioraspoloživost mu ograničava i niska topljivost u vodi (0,4 mg/mL).[6] Zbog toga oralnu primjenu PZQ karakterizira velika varijabilnost u farmakokinetičkim parametrima kao i varijabilna terapijska učinkovitost. Klinička ispitivanja pokazuju da istodobna primjena s hranom bogatom ugljikohidratima vodi do značajnog porasta koncentracije lijeka u krvi.[7] Ispitivanja permeabilnosti na Caco-2 staničnom monosloju (stanična linija humanog kolorektalnog karcinoma Caco-2 stanice) pokazuju da je PZQ izrazito permeabilan, te da se proces apsorpcije lijeka odvija transcelulernim transportom postupkom pasivne difuzije.[8] S obzirom na topljivost i permeabilnost, PZQ se prema biofarmaceutskom sustavu klasificiranja lijekova svrstava u II. skupinu, koju čine uglavnom lipofilni lijekovi kojima topljivost značajno ograničava bioraspoloživost, a time i terapijski učinak.

Iako je u literaturi dostupno više istraživanja vezana uz problematiku niske topljivosti PZQ, taj problem do danas još nije riješen na zadovoljavajući način. Hipoteza predloženog istraživanja je da se mljevenjem u vibracijskom mlinu uz odgovarajuće aditive mogu prirediti novi i do sada neopisani amorfni i/ili kristalni produkti PZQ, koji pokazuju značajno veću topljivost te su po svojim karakteristikama prikladni za razvoj suvremenih ljekovitih oblika i terapijskih sustava tog lijeka. Ciljevi ovog istraživanja su razvoj brzog, ekonomičnog i ekološki prihvatljivog tehnološkog postupka za pripremu polimernih disperzija, inkluzijskih

kompleksa i kokristala PZQ poboljšanih biofarmaceutskih svojstava primjenom mehanokemije, odabir odgovarajućih aditiva u postupku mljevenja te provođenje detaljne biofarmaceutske karakterizacije pripremljenih produkata. Ostvarenje navedenog cilja zahtijeva preciznu regulaciju različitih procesnih varijabli procesa mljevenja, prvenstveno vrijeme mljevenja, kao i odabir vrste aditiva te omjera lijeka i aditiva tijekom procesa mljevenja, s ciljem uspješne pripreme produkta odgovarajućih karakteristika željenog proizvoda. Kao aditivi u postupku mljevenja koristit će se različiti hidrofilni polimeri, organske kiseline i različiti derivati ciklodekstrina. Mljevenje kao metoda pripreme navedenih produkata odabrana je s obzirom na dokumentiranu učinkovitost ovog pristupa u indukciji kemijskih reakcija među komponentama u čvrstom stanju primjenom mehaničke energije (tzv. mehanokemija). Mehanokemijska sinteza u visokoenergetskim mlinovima se u zadnje vrijeme sve više koristi za pripremu različitih supramolekulskih sustava u čvrstom stanju bez ili uz primjenu vrlo malih količina tekućina.[9,10] Zahvaljujući tome, mehanokemija čini okosnicu zelene kemije, propulzivnog područja istraživanja koje je usmjereno na održavanje ravnoteže između primjene prirodnih resursa, ekonomskog rasta i očuvanja okoliša. Uspješna sinteza navedenih produkata zahtjeva opsežnu optimizaciju procesnih varijabli, kao i selekciju odgovarajućih aditiva. Zbog toga će plan istraživanja uključivati slijedeće korake:

1. Izbor odgovarajućih aditiva i optimizacija tehnološkog postupka pripreme čvrstih disperzija, inkluzijskih kompleksa i kokristala PZQ mehanokemijskom aktivacijom tijekom mljevenjem u vibracijskim mikromlinovima s ciljem definiranja komponenata koje mogu biti prikladni aditivi u postupku mljevenja s ciljem povećanja topljivosti i posljedično bioraspoloživosti PZQ. U tu svrhu, mljevenjem u visokoenergetskim vibracijskim mlinovima pripremit će se niz čvrstih disperzija PZQ i različitih polimera, kompleksa s ciklodekstrinima te kokristala s organskim kiselinama. Karakterizacijom uzoraka primjenom difrakcije rengenskih zraka na praškastom uzorku (XRPD) i diferencijalne pretražne kalorimetrije (DSC) pratit će se promjena kristalnosti PZQ u uzorcima kao pokazatelj inetarkcija među komponentama nastalih tijekom mljevenja. Primjenom FTIR i ATR spektroskopije također će se okarakterizirati pripravljeni kompleksi i interakcija među komponentama. Odredit će se optimalan omjer među komponentama u uzorku koje rezultiraju značajnim povećanjem topljivosti.[11] Na kraju, provest će se ispitivanje topljivosti i brzine otapanja pripremljenih produkata u biorelevantnim medijima (simulirani želučani (pH 1,2), simulirani duodenalni (pH 4,5) i

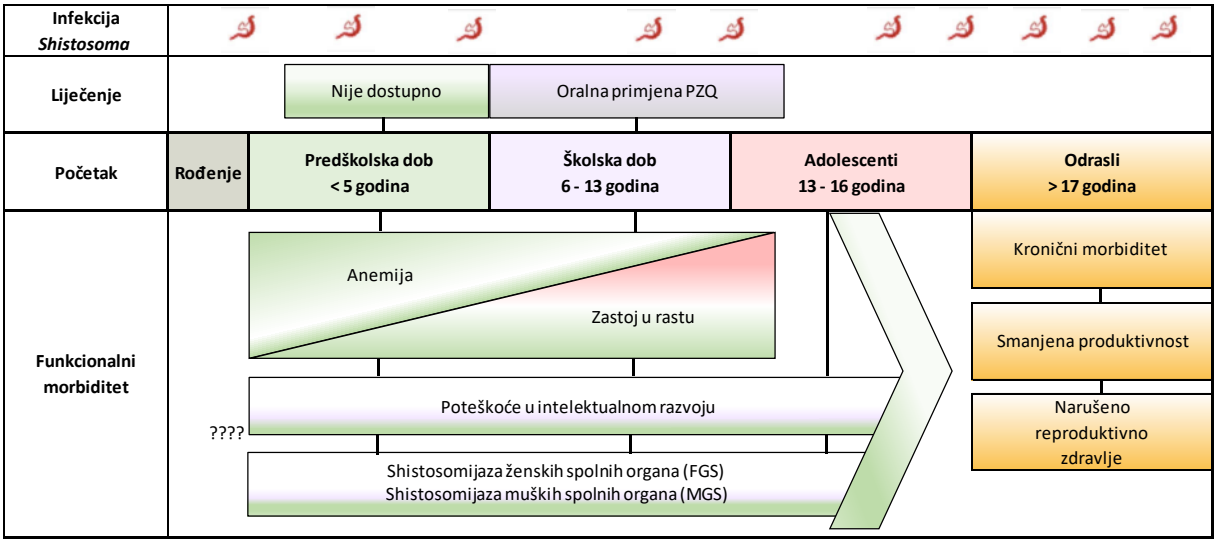
simulirani crijevni (pH 6,8) medij), kako bi se odabrali uzorci koji pokazuju najznačajniji porast topljivosti te stoga imaju potencijal za farmaceutsku primjenu. U tu svrhu razvit će se i validirati HPLC metoda za određivanje količine lijeka.

2. Procjena kemijske stabilnosti PZQ u odabranim uzorcima, pri čemu će se izdvojiti uzorci koji svojom stabilnošću zadovoljavaju farmaceutskim zahtjevima te razjasniti uzroke/mehanizme eventualne nestabilnosti. U tu svrhu, odabrani uzorci analizirat će se primjenom metode ubrzanog starenja (40±2 °C, 75±5 %RH tijekom 3 mjeseca ili dok se ne raspadne do 15% od ukupne količine PZQ), a pratit će se i njihova fotoreaktivnost. Tijekom ispitivanja, u odgovarajućim vremenskim intervalima će se provesti uzorkovanje te odrediti količina PZQ i glavnih razradnih produkta u uzorku.[12] Temeljem toga zaključit će se o uzorcima koji bi mogli biti potencijalni kandidati za sljedeću fazu istraživanja.
3. Ispitivanje permeabilnosti i biokompatibilnosti odabranih uzoraka *in vitro* na Caco 2 staničnom monosloju, s ciljem završnog probira uzoraka s poželjnim svojstvima za farmaceutsku primjenu. Ispitivanjem permeabilnosti na Caco 2 staničnom monosloju[13] odredit će se koeficijent permeabilnosti za ispitivane uzorke s ciljem procjene sistemske apsorpcije lijeka, a praćenjem vijabilnosti (MTT test) tretiranih stanica procijenit će se o biokompatibilnosti testiranih uzoraka.[14]

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Shistosomijaza (bilharcija)

Bilharcija, nazvana prema njemačkom parazitologu Theidoru Bilharzu, (1825. – 1862.), ili shistosomijaza, kronična je tropska bolest od koje danas boluje oko 200 milijuna ljudi u tropskim područjima Afrike i Azije. Uzrokuju je parazitski metilji iz roda *Shistosoma*, koji žive u puževima toplih tropskih voda. Prema dostupnim podacima, shistosomijaza je vrlo stara bolest, a jajašca ovog metilja pronađena su u egipatskim mumijama koje datiraju iz 1300. godine prije nove ere. Bolest se manifestira povećanjem jetre i slezene, oboljenjem urinarnog trakta koje je popraćeno pojavom krvi u mokraći, nadutošću i oslabljenom pokretljivosti ruku i nogu. U nekim afričkim plemenima bolest je postala toliko uobičajena da se pojava krvi u mokraći kod mladića u pubertetu smatra njegovom spolnom zrelošću. Ljudi se zaraze nakon dodira sa vodom koja sadrži parazite koji prodiru u kožu. Glavna zahvaćena skupina su djeca, i to ona školske dobi. Ukoliko se bolest ne liječi na odgovarajući način, dolazi do razvoja kronične anemije, fibroze jetre i mokraćnog mjehura te zastoja u rastu i kognitivnom razvoju djeteta (Slika 1).[15]



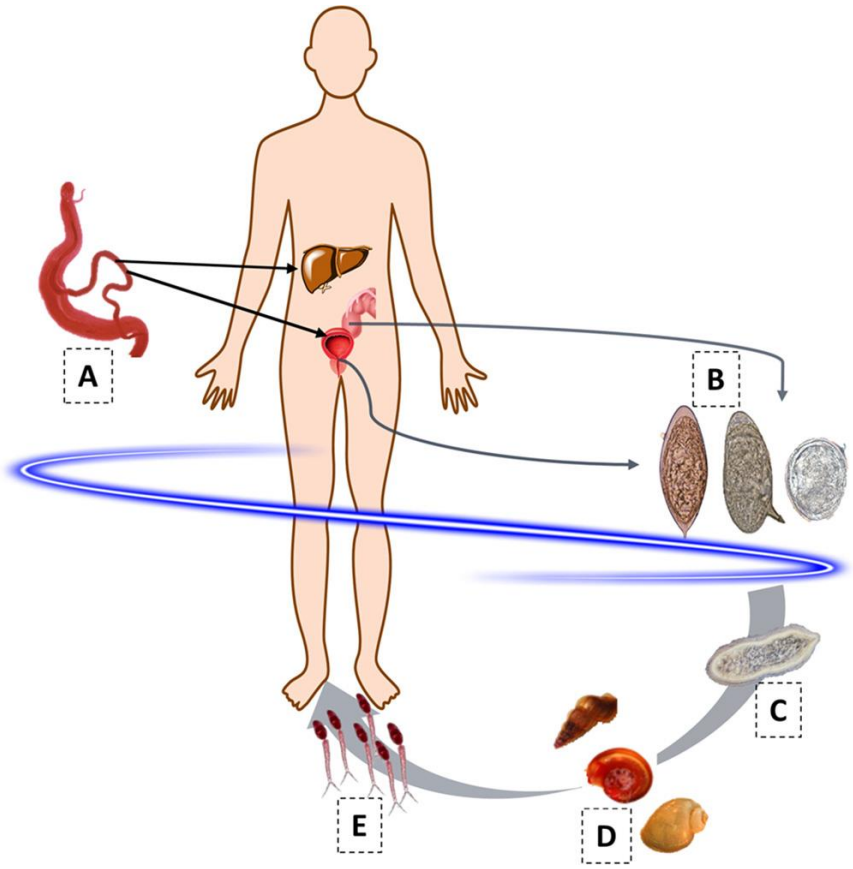
Slika 1. Kronološki tijek nastanka bolesti povezanih sa shistosomijazom.

Upalno stanje zbog infekcije parazitom narušava normalan rast i razvoj (funkcionalni morbiditet) te se manifestira kao anemija i posljedično zaostajanje u rastu, počevši od 2 godine života. Zastoj u rastu može se nadoknaditi ukoliko se liječenje provede prije zatvaranja epifiznih ploča na kostima. Prvo liječenje PZQ provodi se u pravilu tek u školskoj dobi, ali kronična infekcija može biti prisutna već godinama prije, a ponovna infekcija može biti brza. Početak prve manifestacije shistsomijaze spolnih organa nije poznat.[15]

Shistosomijaza je uzrokovana jednom od šest različitih vrsta metilja iz roda *Schistosoma*, a zaraza je najčešće uzrokovana vrstama *Schistosoma haematobium, Schistosoma mansoni* i *Schistosoma japonicum*. Najveći broj oboljelih, (oko 90%) zabilježen je u Africi i to u području subsaharske Afrike, gdje kod zaraženih pojedinaca dominiraju metilji iz roda *S. haematobium* i *S. mansoni*. *S. mansoni* se dodatno javlja i u Latinskoj Americi, najizraženije u Brazilu, dok *S. japonicum* ostaje endem u sedam provincija Narodne Republike Kine, Filipinima i tri mala indonezijska žarišta. Infekcije metiljima roda *S. guineensis, S. intercalatum* i *S. mekongi* su manje učestale te su i geografski ograničene; prva dva uz dijelove rijeke Kongo i donje Gvineje na afričkom kontinentu, dok je *S. mekongi* ograničen na mala žarišta oko granice između Kambodže i Laoške narodne demokratske republike.[16]

Metilji iz roda *Schistosoma* su zanimljivi i po tome što su jedinke odvojenih spolova, što je svojstvo rijetko za metilje. Mužjaci i ženke su uvijek u parovima i žive u venama trbušne šupljine, bubrega i mokraćnog mjehura. Nakon parenja, ženka polaže jaja u vene mokraćnog mjehura i crijeva. Jaja su velika i sadrže bodlju koja probija stjenku mokraćnog mjehura i dopire u njegovu šupljinu. Ozljede koje jaja nanose bubrezima, mokraćnim kanalima i mokraćnom mjehuru dovode do upale, stvaranja rana i pojave krvi u mokraći. Jaja se djelomično izbacuju urinom pa se bolest može utvrditi pronalaženjem jaja u mokraći bolesne osobe. Čovjek je stalni (konačni) domaćin.

Iz jaja, koja su mokraćom dospjela u slatku vodu, razvijaju se ličinke miracidija koje nastoje zaraziti slatkovodnog puža plućaša (prijelazni domaćin). U pužu se razvijaju prvo ličinke sporocista (4-6 tjedana), a zatim ličinke cerkarije. Cerkarija, koja je infektivni razvojni stadij za ljude i druge sisavce, napušta tijelo puža, dospijeva u vodu, a zatim aktivno prodire kroz kožu u tijelo čovjeka. Krvlju dolaze do jetre gdje se razvijaju u mlade metilje. Nakon razdoblja od tri tjedna zrele jedinke migriraju u mokraćni mjehur gdje se oplođuju, proizvode jajašca i tako dovršavaju razvojni ciklus (Slika 2).[3,15]

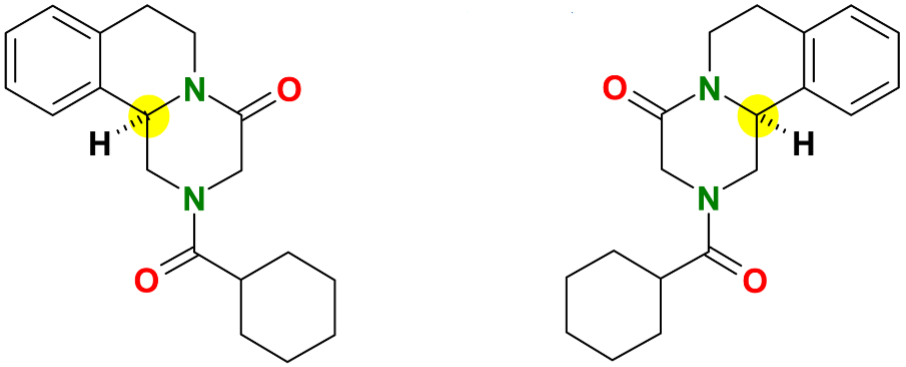


Slika 2. Razvojni ciklus *S. mansoni, S. haematobium* i *S. japonicum*. Faze: A, mužjak i ženka u paru (veća muška omotana ženskom ličinkom); B, jaja (sa lijeva na desno: *S. haematobium, S. mansoni i S. japonicum*); C, trepetljikavi miracidij; D, puž, domaćin (s lijeva na desno, rodovi *Oncomelania, Biomphalaria* i *Bulinus*); E, cerkarija (infektivni oblik).[3]

2.2. Prazikvantel

2.2.1. Kemijska svojstva prazikvantela

Prazikvantel (PZQ, 2-(cikloheksilkarbonil)-1,2,3,6,7,11b-heksahidro-4H-pirazin [2,1a] -izokinolin-4-on), Slika 3) sintetski je derivat izokvinolina molekulske mase 312,41 g/mol. Sadrži okso skupinu na položaju 4, što je vrlo važno za djelotvornost lijeka, a ukoliko je ova skupina modificirana, aktivnost lijeka se smanjuje. Nadalje, PZQ ima kiralni centar u položaju 11b, te stoga ima dva enantiomera s različitim svojstvima. Samo R-(-)-enantiomer posjeduje anthelmintičko djelovanje, te pokazuje veću učinkovitost uz manje nuspojava, dok se primjena (+)-enantiomera povezuje s nuspojavama i izrazito gorkim okusom lijeka. Međutim, komercijalni pripravak je racemična smjesa, jer do sada nije razvijen stereospecifični postupak sinteze.[6,17]



Slika 3. Molekulska struktura prazikvantela.

Prazikvantel je bijeli higroskopan kristalni prah, gorkog okusa, lako topljiv u kloroformu i dimetilsulfoksidu, topljiv u etanolu i vrlo slabo topljiv u vodi.[6,17] Lijek je stabilan pri sobnim uvjetima, tali se pri 136-140 °C uz naknadnu termički posredovanu razgradnju. Prema biofarmaceutskom sustavu klasificiranja lijekova, PZQ se svrstava u II. skupinu, koju čine uglavnom lipofilni lijekovi, što znači da na njegovu učinkovitost znatno utječe proces otapanja.[8]

PZQ je antihelmintik širokog spektra koji djeluje cestocidno protiv zrelih i nezrelih stadija trakavica, a učinkovit je i protiv metilja. Danas je lijek izbora te jedini dostupan lijek za liječenje ljudi zaraženih parazitskim glistama, koje uzrokuju shistosomijazu, jednu od najčešćih parazitskih tropskih bolesti. Procjenjuje se da od shistosomijaze (bilharcije) danas boluje oko 240 milijuna osoba, uglavnom u slabo razvijenim tropskim zemljama Afrike i Azije, koje nemaju pristup pitkoj vodi i razvijenu sanitarnu mrežu.[6,17] Stoga je PZQ uključen u listu osnovnih lijekova koji su minimum zahtjeva za osnovnu medicinsku skrb djece i odraslih prema odredbama Svjetske zdravstvene organizacije.[18] PZQ se koristi kao preventiva zaraze te u liječenju oboljelih. Ovaj lijek, razvijen sedamdesetih godina prošlog stoljeća, je ekonomski prihvatljiv i siguran za uporabu zahvaljujući niskom stupnju toksičnosti te pokazuje prihvatljiv terapijski profil, ali je njegova uporaba ograničena mnogim nedostacima. Oni su u prvom redu povezani s činjenicom da se lijek primjenjuje kao racemična smjesa. S obzirom da terapijska doza iznosi 20 mg lijeka po kg tjelesne mase, komercijalno dostupna oralna formulacija koja sadrži 600 mg lijeka je izrazito voluminozna te neugodnog, gorkog okusa.[19,20] Sve to značajno ograničava primjenu lijeka pedijatrijskim pacijentima koji su najčešće pogođeni bolešću. Posebno je problematična primjena ove formulacije djeci mlađoj

od 6 godina, koje ne mogu progutati komercijalno dostupnu tabletu koja sadrži 600 mg PZQ.[21]

2.2.2. Doziranje i učinkovitost prazikvantela

Doziranje i primjena PZQ ovisi o vrsti metilja kojom je zaražen bolesnik te o tome provodi li se tretman s ciljem izlječenja postojeće infestacije ili s ciljem prevencije buduće infestacije (kemoprevencija):

- Infekcija krvnim metiljem roda Schistosoma – 20 mg/kg uz hranu, svakih 4-6 sati, kao tri doze tijekom jednog dana. Tretman se mora ponoviti nakon 4 do 6 tjedana. Za rizične populacije, kao preventivna kemoterapija, koristi se pojedinačna doza od 40 mg/kg, a preporučena frekvencija doziranja je jednom u godinu dana u područjima s visokim rizikom zaraze, dok u područjima s relativno niskim rizikom zaraze se preporuča ponoviti preventivnu kemoterapiju svake dvije godine. U program su u pravilu uključena djeca starija od 4 godine, odnosno 94 cm visine, a nedavno je ta granica smanjena na djecu visine do 60 cm, dok za djecu mlađih uzrasta, koji su naročito rizična skupina za razvoj shistomonijaze, ne postoje klinički podaci o sigurnosti primjene PZQ, kao ni odgovarajući ljekoviti oblici. Konačan cilj kemopreventivnog programa je potpuna eliminacija zaraze iz zahvaćenih područja, što nameće potrebu liječenja djece starosti od 1 do 4 godine, za što je potrebno razviti odgovarajuće oblike lijeka. Tek nedavno je u promet stavljena oralna formulacija PZQ u dozi od 150 mg, što bi trebalo značajno unaprijediti kemoprevenciju i liječenje shistomonijaze u male djece.
- Infekcija orijentalnim jetrenim metiljem (klonorhioza) i infekcija s jednom od dvije vrste jetrenog metilja Opisthorchis – 25 mg/kg tri puta u jednom danu.
- Trakasti crvi – 10-25 mg/kg u jednoj dozi.

Trudnicama se lijek propisuje samo ako je neophodno, a dojiljama se preporuča prekinuti dojenje na dan primjene i tijekom slijedećih 24 sata, s obzirom da se lijek izlučuje i putem majčinog mlijeka.[22,23]

Učinkovitost PZQ u izlječenju shistomonijaze prati se određivanjem broja jajašaca u urinu te odsustvom hematurije nakon provedenog liječenja. Meta analiza do sada provedenih kliničkih studija, koje su uključivale 15549 djece od kojih je 14340 (92%) testirano između 3 i 8 tjedana nakon tretmana sa 40 mg/kg PZQ-a pokazuje da stopa izlječenja za vrste metilja *S. haematobium, S. mansoni* i *S. japonicum* iznosi 73,6%, 76,4% i 94,7%. Srednja dob tretirane djece bila je 10 godina (raspon od 1 do 19 godina), od koje je 11% bilo predškolske dobi.[24]

Ponovljena preventivna primjena PZQ u dozi od 40 mg/kg tjelesne težine 3-4 tjedna nakon primarnog kemopreventivnog tretmana dodatno povećava učinkovitost tretmana.[25] S druge strane, neki autori predlažu povećanje kemopreventivne doze na 60 mg/kg tjelesne težine, s obzirom da u toj dozi lijek pokazuje veću učinkovitost.[1] Pri tome, liječenje se uglavnom dobro podnosi, uz manje i prolazne nuspojave kao što su bol u trbuhu, dijareja i pospanost. Za prilagodbu doze PZQ potrebama djece različitog uzrasta koriste se različiti pristupi. Lomljenje i usitnjavanje tableta, koje se zatim primjenjuju pomiješane s hranom pokazalo je zadovoljavajuću kliničku učinkovitost, dok je lijek formuliran kao sirup (Epiquantel®) pokazao smanjenu učinkovitost, no razlozi takvog rezultata nisu razjašnjeni.[26]

Osim u humanoj, PZQ se koristi i u veterinarskoj medicini. U kombinaciji sa pirantel embonatom i febantelom PZQ se koristi za dehelminitizaciju mačaka i pasa oba spola, uključujući i mačiće i štence, bez smanjenja doze kod primjene na mlađim životinjama.[27]

2.2.3. Farmakodinamička svojstva PZQ

Unatoč mnogim godinama uspješne primjene i izliječenja milijuna ljudi, točan mehanizam djelovanja PZQ-a još nije u potpunosti razjašnjen.[3,28] Smatra se da je cestoidno djelovanje lijeka temeljeno na svojstvu prazikvantela da oštećuje kutikulu trakavica što uzrokuje spastičku paralizu njihova mišića. Djeluje na parazite u sluznici duodenuma i na juvenilne oblike ehinokoka skrivene u Liberkinijevim kriptama. Nekoliko sekundi po interakciji prazikvantela sa fosfolipidima i proteinima trakavica, ošteti se njihova kutikula. U stanice nametnika ulaze ioni Ca^{2+}, a cijela strobila se kontrahira. Kontrakcija mišića je primarni efekt na koji se nadovezuje brza vakuolizacija kutikule. Iz rosteluma otpadnu kukice, siske trakavica se izobliče, zakoči resorpcija glukoze, a tenije ubrzo utroše zalihe glikogena. Trakavice uginu nakon dehelmintizacije i budu razgrađene proteolitičkim enzimima domaćina. Zbog toga se u izmetu rijetko nađu cijele tenije, njihovi skoleksi ili dijelovi članaka.[29]

Kod metilja, smatra se da PZQ također uzrokuje pojačani influks iona kalcija, što dovodi do paralize nametnika. Osim toga, PZQ narušava strukturu tegumenta, zaštitne ovojnice tijela parazita koja ga štiti od prepoznavanja od strane imunološkog sustava domaćina te na taj način sprečava njegovo otkrivanje i eliminaciju. U kontaktu s lijekom, zaštitna ovojnica mijenja strukturu te dolazi do vakuolizacije, uslijed čega dolazi do otkrivanja antigena parazita te posljedičnog imuno-odgovora organizma domaćina, koja je posredovana protutijelima te stanicama, pretežno limfocitima T i makrofagima. Ovaj

mehanizam djelovanja lijeka dominantan je kod starijih jedinki parazita. Nadalje, neki autori navode da se antihelmintički učinak PZQ može povezati i sa vezanjem lijeka na aktinska i miozinska vlakna, čime se mijenja fluidnost unutarstaničnih membrana parazita te ograničava promet fosfoinozitida, što posljedično smanjuje razine glutationa te narušava staničnu homeostazu parazita.[30]

Iako točan mehanizam antihelmintičkog djelovanja PZQ još treba istražiti, nije zabilježen razvoj i pojava klinički značajne rezistencije na lijek. Terapijski učinak PZQ je najizraženiji na sam dan infekcije, nakon čega parazit postaje ponovno osjetljiv na ovaj lijek tek kada postigne zrelost od 4 – 5 tjedana.[16]

2.2.4. Farmakokinetička svojstva PZQ

Nakon oralne primjene PZQ se brzo i skoro u cijelosti resorbira iz crijeva, a vrlo slaba topljivost u vodi je ograničavajući faktor za apsorpciju u probavnom traktu. Klinička ispitivanja pokazuju da istodobna primjena s hranom bogatom ugljikohidratima vodi do značajnog porasta koncentracije lijeka u krvi.[7] Više od 80% apsorbiranog lijeka veže se na serumske proteine. Lijek podliježe metaboličkoj razgradnji tijekom prvog prolaska kroz jetru, uglavnom putem izoenzima CYP2B1 i CYP3A4, te citokroma P450. Jedan sat nakon primjene, približno samo 6% lijeka u serumu je u nemetaboliziranom obliku, a metaboliti se izlučuju urinom unutar četiri dana nakon primjene. Izlučivanje može biti odgođeno u bolesnika s oštećenom funkcijom bubrega, ali se ne očekuje nakupljanje lijeka. PZQ prolazi krvno-moždanu barijeru i koncentracija lijeka u likvoru je oko 14-20% od ukupne koncentracije u plazmi. Izlučuje se u mlijeku dojilja, a koncentracija iznosi oko 25% serumske koncentracije lijeka.

Osim konvencionalnih tableta za oralnu primjenu, ispitana je bioraspoloživost L-PZQ iz raspadljivih tableta za usta koje su oblikovane korištenjem racemične smjese lijeka u dozi od 40 mg te raspadljivih tableta za usta koje su sadržavale samo L-PZQ. Farmakokinetički podaci na zdravim dobrovoljcima pokazuju usporedivu relativnu bioraspoloživost L-PZQ primjenom raspadljivih tableta oblikovanih sa racemičnom smjesom lijeka i konvencionalnih tableta (Cysticyde®), dok je primjenom formulacije s L-PZQ ostvarena relativna bioraspoloživost lijeka od 40% u odnosu na konvencionalnu tabletu. Iako razlog ovakvog rezultata nije poznat, autori kao moguće objašnjenje navode potencijalno protektivni učinak R-PZQ tijekom metaboličke razgradnje lijeka do kojeg dolazi primjenom lijeka u obliku racemične smjese.[31]

Klinička ispitivanja pokazuju da kod bolesnika sa umjerenom do teškom disfunkcijom jetre (Child-Pugh klasa B i C), dolazi do progresivnog porasta poluvremena eliminacije ($T_{1/2}$), smanjenja maksimalne plazmatske koncentracije lijeka (c_{max}) te površine ispod krivulje (*AUC*), zavisno o stupnju oštećenja jetre. Kod bolesnika s umjerenom disfunkcijom (Child-Pugh klasa B), porast vrijednosti $T_{1/2}$, c_{max} i *AUC* je 1,58 puta, 1,76 puta, odnosno 3,55 puta u odnosu na populaciju s normalnom funkcijom jetre, a u bolesnika s teškom disfunkcijom (Child-Pugh klasa C) porast je 2,82 puta, 4,29 puta i 15 puta.[18]

2.2.5. Ostala područja primjene PZQ

Novija predklinička ispitivanja pokazuju da PZQ sinergistički pojačava antiproliferativni učinak paklitaksela (PTX-a). Kao jedan od najčešće korištenih lijekova protiv karcinoma, PTX pokazuje veliku učinkovitost protiv velikog broja zloćudnih bolesti, uključujući rak dojke, glave i vrata, jajnika te većih stanica raka pluća. Međutim, pojava kliničke rezistencije i velikog broja ozbiljnih nuspojava stvaraju značajne probleme prilikom terapije PTX-om.[32] Kao posljedica toga, studije su usmjerene na razvoj sinergističke terapije PTX-om s ciljem pronalaska učinkovitog rješenja za savladavanje problema rezistencije PTX-a i smanjenje nuspojava bez smanjenja djelotvornosti lijeka. Kao što je spomenuto, PZQ može pojačati inhibicijski učinak PTX-a u različitim stanicama raka, uključujući i one koje su otporne na PTX-a, iako samostalna primjena PZQ nije pokazala citotoksični učinak. Sposobnost PZQ da pojačava citotoksične učinke PTX-a također je potvrđena na modelu mišjeg ksenografta. Nadalje, PZQ učinkovito inhibira P-glikoprotein (Pgp), čija je aktivnost između ostalog povezana sa razvojem rezistencije tumora na citostatike.[5] Kombinacija PZQ-a sa PTX-om može rezultirati novim strategijama za učinkovitiju antitumorsku terapiju.[4]

Istraživanja na animalnim modelima ukazala su na moguće imunomodulatorno djelovanje PZQ. Nadalje, studije na humanim CD4+ T-limfocitima pokazuju da PZQ pojačava proliferaciju T-stanica i produkciju citokina.[33] Smatra se da PZQ pokazuje izravan i neizravan imuno-modulirajući učinak, ublažavajući upalnu reakciju koja je jedan od simptoma shistomonijaze. Temeljem navedenog, čini se da bi PZQ mogao biti terapijski učinkovit i u liječenju drugih upalnih stanja kod kojih postoji potreba za regulacijom imunološkog odgovora organizma.

2.3. Postupci povećanja topljivosti teško topljivih lijekova

Topljivost lijeka ima ključan utjecaj na njegova farmakokinetička i farmakodinamička svojstva te je ključan parametar koji određuje razvoj formulacije lijeka. Otapanje lijeka temelji se na prekidanju međusobnih veza molekula lijeka te na posljedičnom nastajanju novih veza između molekula lijeka i otapala. Pri tome, jačina tih interakcija određuje ukupnu topljivost lijeka. Uz permeabilnost, topljivost lijeka je jedan od parametara prema kojemu se lijekovi razvrstavaju u skupine prema biofarmaceutskoj klasifikaciji lijekova (Slika 4).[34]



Slika 4. Biofarmaceutska klasifikacija lijekova.[34]

Od 200 najčešće propisivanih lijekova za oralnu primjenu u Europi i Sjedinjenjem Američkim Državama, lijekovi niske topljivosti zastupljeni su s oko 40%. Primjena tehnika molekularnog modeliranja i jedinica za brzi probir aktivnih tvari rezultirala je značajnim porastom lipofilnosti (osigurava veći afinitet vezanja lijeka na receptor) i molekulske mase novih lijekova koji se nalaze u naprednim fazama razvoja. Temeljem toga, lijekovi niske topljivosti čine više od 90% novih kemijskih entiteta, 75% lijekova u naprednim fazama razvoja te 33% lijekova zastupljenih u oficinalnim farmakopejama.[34] Zbog toga povećanje topljivosti lijekova predstavlja temeljni preduvjet za uspješan razvoj formulacije i kliničku primjenu lijeka. U tu svrhu koriste se različite strategije, koje uključuju prilagodbu pH vrijednosti formulacije, sintezu prolijekova, usitnjavanje, primjenu suotapala, promjenu kristralnog oblika lijeka, izradu polimernih disperzija te uporabu površinski aktivnih tvari, lipida i ciklodekstrina.

2.3.1. Primjena čvrstih disperzija u povećanju topljivosti lijeka

Čvrste disperzije se definiraju kao sustavi kojima je lijek jednolično raspodijeljen unutar odgovarajućeg polimernog matriksa, najčešće hidrofilnih svojstava. Pri tome lijek može biti u amorfnom obliku uslijed nastajanja molekularne disperzije unutar polimernog matriksa, eutektičkih smjesa i staklastih otopina ili može biti u obliku kristalnih zona koje su jednolično raspodijeljene unutar polimernog matriksa. Prisustvo hidrofilnog polimera olakšava solvataciju čestica lijeka otapalom, što je prvi korak u procesu otapanja.[35] Nadalje, lijek je u polimernom matriksu prisutan u amorfnom obliku ili kao mikrokristali, što sve pridonosi porastu brzine otapanja.[36] Termodinamički, amorfne čvrste tvari pokazuju veću topljivost, veću brzinu otapanja i molekularnu pokretljivost u usporedbi s njihovim odgovarajućim kristalnim stanjem. Nasuprot tome, za otapanje kristalnog materijala, potrebna je dodatna energija za kidanje veza unutar kristala.

2.3.2. Priprema čvrstih disperzija

Razvijene su mnoge metode za pripremu čvrstih disperzija. Neke se provode u suhom stanju, kao što je metoda mljevenja i metoda taljenja, dok druge uključuju otapanje lijeka i polimera u odgovarajućem otapalu ili smjesi otapala, koje se zatim uklanja liofilizacijom, sušenjem raspršivanjem ili uparavanjem pri sniženom tlaku.[35] Odabir metode pripreme čvrstih disperzija ponajprije je uvjetovan fizikalno-kemijskim karakteristikama djelatne tvar i polimera. Pregled tehnologija izrade registriranih lijekova koji su formulirani kao čvrste disperzije, kao i polimera korištenih u njihovoj izradi prikazan je u Tablici 1. Prethodne studije su pokazale da izbor metode pripreme ima značajan utjecaj na fizikalno-kemijska svojstva čvrstih disperzija te dovodi do različitog učinka konačnog proizvoda.[37]

Tablica 1. Popis komercijalnih proizvoda koji koriste metode za pripremu čvrstih disperzija.[37]

Zaštićeno ime proizvoda	Metoda pripreme	Djelatna tvar	Polimerni nosač
Invicek®	Sušenje raspršivanjem	Teleprevir	HPMCAS-M
Sporanox®	Sušenje raspršivanjem na šećerne kuglice	Itrakonazol	HPMC
Casamet®	-	Nabilon	PVP
Prograf®	Sušenje raspršivanjem	Takrolimos	HPMC
Kaletra®	Ekstruzija taline	Lopinavir	PVP
Zelboraf®	Ko-taloženje	Vemurafenib	HPMCAS
Kalydeco®	Sušenje raspršivanjem	Ivakaftor	HPMCAS
Onmel®	Ekstruzija taline	Itrakonazol	HPMC
Novir®	Ekstruzija taline	Ritonavir	PVP
Zotress	Sušenje raspršivanjem	Everolimus	HPMC
Crestor®	Sušenje raspršivanjem	Rosuvastatin	HPMC
Gris-PEG®	Ekstruzija taline	Grizeofulvin	PEG
Isoptin®	Sušenje raspršivanjem	Verapamil	HPC/HPMC
Afeditab®	Sušenje raspršivanjem	Nifedipin	Poloxamer-PVP
Rezulin®	Sušenje raspršivanjem	Troglitazon	HPMC
Nivadil®	Sušenje raspršivanjem	Nivaldipin	HPMC

Mljevenje je ekonomična i lako prilagodljiva metoda za proizvodnju čvrstih disperzija. U ovoj tehnici se lijek i polimer melju u različitim mlinovima, a u praksi se najčešće koristi kuglični mlin i vibracijski mlin.[38] Mljevenjem se znatno smanjuje veličina čestica lijeka, a moguća je pretvorba lijeka iz kristalnog u amorfni oblik. U pravilu, mljevenje pri niskoj temperaturi pogoduje amorfizaciji lijeka, a ukoliko se postupak provodi pri temperaturama iznad temperature staklastog prijelaza lijeka (Tg) nastaje kristalni oblik.[39,40] Usporedbom sa ostalim metodama pripreme utvrđeno je da su čvrste disperzije pripremljene mljevenjem u pravilu heterogenije, pri čemu dolazi do uspostavljanja manje interakcija između lijeka i polimera, a produkt pokazuje najnižu fizikalnu stabilnost.[38,39]

Taljenje je jedna od prvih i najčešće korištenih metoda pripreme čvrstih disperzija. U konvencionalnom procesu taljenja lijek i polimeri se rastope na temperaturi koja je viša od one za eutektičku smjesu polimera i lijeka. Pokretljivost molekula unutar taline tada je dovoljno visoka da lijek može uspješno reagirati s polimerom, pri čemu nastaju različiti tipovi čvrstih disperzija. Brzina hlađenja također može utjecati na način interakcije. Općenito, što je hlađenje brže, kristalnost lijeka u konačnom produktu je smanjena. Glavne prednosti metode taljenja su njezina jednostavnost i dostupnost te prikladnost za industrijsku proizvodnju polimernih disperzija lijeka. No, proces taljenja zahtjeva primjenu visokih temperatura pri čemu može doći do razgradnje djelatne tvari ili polimernog nosača. Zbog toga ova metoda nije prikladna za izradu čvrstih disperzija termolabilnih lijekova ili lijekova s visokim talištem, jer može doći do termičke razgradnje polimernog nosača. Nadalje, metoda taljenja može se primijeniti samo kada se i lijek i nosač u rastaljenom stanju dobro miješaju.[41]

Metode bazirane na otapanju omogućuju izradu čvrstih disperzija bez rizika od termičke razgradnje djelatne tvari ili polimernog nosača budući da se postupak može provesti bez pretjeranog zagrijavanja. Postupak uključuje otapanje smjese lijeka i polimernog nosača u zajedničkom otapalu ili smjesi otapala te posljedično uklanjanje otapala, a pripremljeni kruti produkt se može naknadno usitniti na prikladnu veličinu.[42] Pri tome je važno da su lijek i polimer topljivi u istom otapalu ili smjesi otapala što često nije slučaj. Poželjno je koristiti hlapljivo otapalo koje dobro otapa smjesu lijeka i polimera. Najčešće se koriste otapala sa niskim vrelištem kao što su metanol, etanol, aceton i kloroform i njihove smjese.[43,44,45] Umjereno zagrijavanje može poboljšati topljivost komponenata i pridonijeti homogenosti smjese.[46] U procesu sušenja potrebno je spriječiti odvajanje faza kako bi se pripremio što homogeniji sustav. Tijekom uklanjanja otapala, molekule lijeka imaju sklonost odvajanja od polimernog nosača i kristalizaciji zbog svoje velike molekularne pokretljivosti u otapalu. Dva ključna faktora prilikom razdvajanja faza su temperatura sušenja i brzina isparavanja otapala. Sušenje pri visokoj temperaturi može povećati pokretljivost molekula lijeka što pridonosi razdvajanju faza, ali visoka temperatura može također rezultirati bržim sušenjem te je vrijeme u kojem može doći do razdvajanja faza minimalno.[47] Stoga tijekom brzog sušenja nastaje produkt visoke homogenosti.[48] Za uklanjanje otapala koriste se razne tehnike, poput sušenja pri sniženom tlaku, sušenja raspršivanjem, sušenja smrzavanjem i slično.[49,50,51,52] U postupku sušenja pod sniženim tlakom, otapalo se uklanja na umjerenoj temperaturi (obično 40-80 ºC, ovisno o otapalu) i pri sniženom tlaku, a nastale čvrste disperzije se pohranjuju pod vakuumom u eksikatorima kako bi se uklonilo preostalo adsorbirano otapalo. Metoda je jednostavna za primjenu, a umjerena temperatura nosi manji rizik od razgradnje djelatne tvari

u odnosu na taljenje. Usprkos tome, proces sušenja je spor i provodi se pri relativno visokim temperaturama što potencira razdvajanje faza u produktu. Sušenje raspršivanjem je najprikladnija metoda za pripremu čvrstih disperzija jer omogućava izuzetno brzo uklanjanje otapala, što smanjuje rizik od razdvajanja faza i rezultira homogenijim produktom. U ovoj metodi otopina lijeka i polimera se atomizira u fine kapljice u struji zagrijanog plina za sušenje.[53] Zbog velike specifične površine kapljica isparavanje otapala je brzo, a prilagodbom tehnoloških parametara procesa sušenja se mogu precizno kontrolirati karakteristike produkta kao što su veličina čestica, sadržaj vlage i slično. Sušenje zamrzavanjem ili liofilizacija, značajna je metoda sušenja u pripremi čvrstih disperzija jer se provodi pri niskoj temperaturi koja može učinkovito smanjiti rizik odvajanja faza i/ili termičke razgradnje komponenata polimerne disperzije. Smrzavanje uzorka provodi se uranjanjem otopine lijeka i polimera u tekući dušik. Ograničenje ove metode je u niskoj temperaturi smrzavanja većine organskih otapala, što otežava održavanje otapala u zamrznutom stanju tijekom procesa sušenja. Pored toga, niske temperature usporavaju sušenje te stoga mogu pogodovati razdvajanju faza u konačnom produktu.[47]

U pravilu amorfni oblik lijeka je metastabilan, odnosno niže stabilnosti u usporedbi s kristalnim oblikom, zbog čega amorfna krutina pokazuje veću topljivost i veću brzinu otapanja. U isto vrijeme, amorfni oblik lijeka pokazuje i veću kemijsku i fizikalnu nestabilnost u odnosu na odgovarajući kristal.[54] Zbog toga, kod amorfnih polimernih disperzija postoji velika mogućnost razdvajanja faza i kristalizacije lijeka koja se može pojaviti tijekom pripreme, skladištenja ili primjene pripravka.[11,55] Polimeri obično djeluju kao učinkoviti inhibitori kristalizacije uslijed interakcija sa molekulama lijeka. Upotreba polimera također može utjecati na vrijednosti temperature staklastog prijelaza lijeka (*Tg*) u čvrstim disperzijama, a njeno povećanje iznad temperature skladištenja smanjuje molekularnu pokretljivost lijeka u uzorku te se očekuje povećanje fizičke stabilnosti produkta.[35]

2.3.3. Primjena čvrstih disperzija u povećanju topljivosti PZQ

U literaturi je dostupno više istraživanja vezanih uz primjenu čvrstih disperzija s ciljem prevladavanja problema vezanih uz nisku topljivost PZQ. Čvrste disperzije PZQ i polivinilpirolidona (PVP) pripremljene su postupkom evaporacije iz etanolnih otopina. Ispitivanja su pokazala da ovim pristupom nije ostvareno značajnije povećanje brzine otapanja lijeka, vrlo vjerojatno zbog nastajanja kompleksa PZQ i PVP ograničene topljivosti.[57] Čvrste disperzije PZQ u Poloksameru 188 i polietilenu 4000 (PEG) pripremljene su granulacijom taljenjem, te ultrazvučnim raspršivanjem i kogeliranjem. Udio PZQ u

pripremljenim uzorcima iznosio je do 10%. *In vitro* ispitivanje brzine otapanja lijeka iz pripremljenih produkata pokazala su porast brzine oslobađanja lijeka od 200%, no samo u formulacijama u kojima je maseni udio lijeka iznosio svega 5%. Uzimajući u obzir da je doza PZQ-a 600 mg, primjena u obliku ovakvih mikrosfera je neprikladna zbog izrazite voluminoznosti pripravka.[58] Novija farmakokinetička istraživanja na psima potvrđuju da čvrste disperzije PZQ s kombinacijom Poloksamera 188 i PEG 400 su učinkovita strategija za povećanje oralne bioraspoloživosti lijeka. U odnosu na komercijalno dostupnu tabletu, primjena navedene čvrste disperzije rezultirala je porastom maksimalne plazmatske koncentracije lijeka za 3,2 puta, smanjenjem vremena potrebnog za postizanje maksimalne plazmatske koncentracije za 1,4 puta te porastom oralne bioraspoloživosti lijeka za 2,3 puta[59]. No s obzirom da su čvrste disperzije pripremljene u masenom omjeru lijeka i smjese polimera 1:5, takav produkt je izrazito voluminozan, što dovodi u pitanje njegovu primjenu u humanoj medicini.

Pripremom čvrstih disperzija sa hidrogeniranim ricinusovim uljem postupkom taljenja kao i uklapanjem PZQ-a u hidrogel dekstrana nije ostvarena zadovoljavajuća topljivost lijeka te je njegovo oslobađanje iz razvijenih formulacija nepotpuno. Pokazalo se da topljivost ovisi o pH mediju, te da je ona manja u kiselom nego u neutralnom i lužnatom mediju. Povećanje topljivosti PZQ u navedenim sustavima pripisano je sinergističkom učinku nekoliko čimbenika kao što su smanjenje veličine čestica lijeka, kristaliničnost i slično.[60]

U literaturi su opisana istraživanja kojima je cilj bio razviti parenteralnu formulaciju lijeka s produženim oslobađanjem PZQ, uglavnom za veterinarsku primjenu. Temeljem svojih karakteristika, navedene formulacije se klasificiraju kao čvrste disperzije. Razvijeni su implantati bazirani na poli-ε-kaprolaktonu[61] te njegovim smjesama s polietilenglikolom[62], a opisane su PLGA (kopolimer mliječne i glikolne kiseline) kao i čvrste lipidne nanočestice s PZQ.[63,64] Iz razvijenih formulacija oslobađanje PZQ je uglavnom nepotpuno, što se povezuje s niskom topljivosti lijeka te je razvidno da su potrebna dodatna istraživanja s ciljem rješavanja tog problema.

2.4. Ciklodekstrini

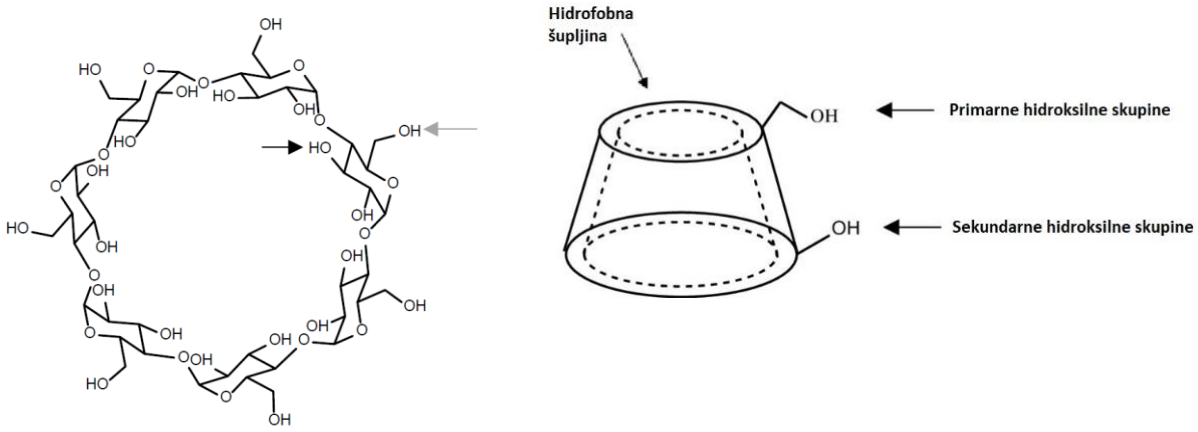
2.4.1. Struktura i derivati ciklodekstrina

Amorfne produkte lipofilnih lijekova s poboljšanom topljivošću moguće je prirediti i korištenjem ciklodekstrina (CD).[65] CD su ciklički oligosaharidi građeni od 6 (α-CD), 7 (β-CD), 8 (γ-CD) ili više glukopiranoznih jedinica vezanih α-1-4-glikozidnom vezom (Slika 5). Najstabilnija konfiguracija molekule CD je oblika krnjeg stošca sa centralnom šupljinom ciklodekstrina, a posljedica je konformacije stolice glukopiranoznih jedinica. Konusni oblici molekula CD imaju centralnu šupljinu dubine 0,79 nm, dok se sa porastom glukopiranoznih jedinica povećava i promjer centralne šupljine molekule CD (Slika 5).[66]



Slika 5. Struktura i dimenzije prirodnih ciklodekstrina (α, β i γ ciklodekstrini).[66]

Kako slobodna rotacija oko α-1,4 veze nije moguća zbog steričkih razloga, CD nisu cilindrične molekule već konusni prstenovi. Zbog konformacije stolice glukopiranoznih jedinica, sekundarne hidroksilne skupine u molekuli CD protežu se oko šireg otvora, a primarne sa uskog otvora molekule (Slika 6).[67] Smanjenje promjera centralne šupljine na strani primarnih hidroksilnih skupina, posljedica je slobodne rotacije primarnih hidroksilnih skupina.[68]



Slika 6. Orijentacija primarnih i sekundarnih hidroksilnih skupina unutar molekule ciklodekstrina.[67]

Kako je unutrašnjost molekule CD omeđena C-C, C-H i C-O-C vezama, vanjski dio molekule ima hidrofilna svojsta, a sama molekula lipofilni karakter. Površina molekule CD sadrži velik broj hidroksilnih skupina, te je samim time hidrofilna i dobro topljiva u vodi. Prema tome, upotreba CD jedna je od dostupnih tehnologija za poboljšanje topljivosti lijekova koji su slabo topljivi u vodi. Najznačajnije svojstvo CD je njihova sposobnost da mijenjaju nepovoljne fizikalno-kemijske karakteristike molekula koje su smještene unutar njihove unutarnje šupljine stvaranjem inkluzijskih kompleksa.[69,70]

U unutrašnjosti molekule CD nastaju vodikove veze između hidroksilnih skupina C2-OH i C3-OH susjednih glukopiranoznih jedinica, što rezultira rigidnom strukturom te pridonosi nastanku izrazito stabilne kristalne rešetke. Nadalje, nastankom većeg broja intermolekulskih vodikovih veza smanjuje se broj hidroksilnih skupina slobodnih za interakciju s molekulama vode, a to smanjuje topljivost molekule (Tablica 2).[69] U molekuli β-CD uspostavlja se prsten od 7 vodikovih veza, zbog čega taj derivat pokazuje najnižu topljivost, dok kod αCD nastajanje prstena vodikovih veza ne zahvaća sve OH skupine, pri čemu nastaje samo četiri od šest mogućih vodikovih veza, pa je taj derivat značajno topljiviji. Nasuprot tome, γ–ciklodekstrin ima fleksibilniju strukturu, veze su najslabije, te je stoga najtopljiviji derivat među prirodnim CD. Iz navedenog je vidljivo da topljivost prirodnih CD nije izravno proporcionalna broju glukopiranoznih jedinica, kao ni broju hidroksilnih skupina u molekuli.[69,70]

Tablica 2. Fizikalno-kemijska svojstva prirodnih ciklodekstrina.[69]

	α-ciklodekstrin	**β-ciklodekstrin**	**γ-ciklodekstrin**
Broj glukoznih jedinica po molekuli	6	7	8
Molekulska masa (g mol^{-1})	972	1135	1297
Vanjski promjer centralne šupljine (Å)	14,6	15,4	17,5
Unutarnji promjer centralne šupljine (Å)	4,7 – 5,3	6,0 – 6,5	7,5 – 8,3
Visina (Å)	7,9	7,9	7,9
Topljivost u vodi na sobnoj temperaturi (%)	14,5	1,85	23,2

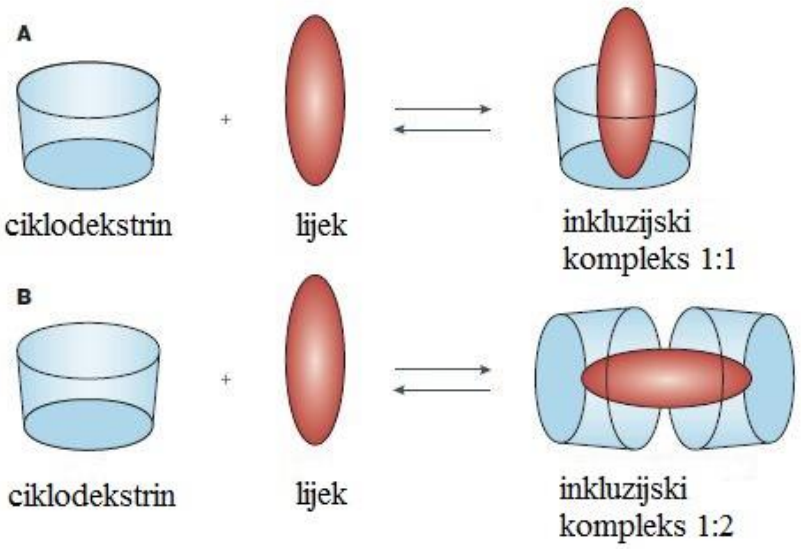
U farmaceutske svrhe se najčešće koristi β-CD, zbog dimenzija centralne šupljine koja omogućuje nastajanje inkluzijskih kompleksa velikog broja lijekova i ksenobiotika, jednostavnog načina sinteze te prihvatljive cijene. Međutim, kao što je ranije istaknuto, taj derivat je ograničene topljivosti koja je uzrokovana nastajanjem brojnih intramolekularnih vodikovih veza i posljedično visokom energijom kristalne rešetke. Slaba topljivosti u vodi i sklonost stvaranja kompleksa ograničene topljivosti potaknula je sintezu niza derivata β-CD, koji se najčešće priređuju aminacijom, esterifikacijom i eterifikacijom primarnih i sekundarnih hidroksilnih skupina molekule β-CD. Uvođenjem novih supstituenata u strukturu β-CD sprečava se nastajanje prstena vodikovih veza što posljedično pridonosi porastu topljivost. Osim toga, pri tome nastaje velik broj stereoizomera čime kristalinični ciklodekstrin poprima amorfnu strukturu što dodatno povećava topljivost derivata. Osim topljivosti, sintezom novih derivata mijenja se volumen hidrofobne šupljine β-CD, a time i njihova sposobnost stvaranja inkluzijskih kompleksa. U pravilu, kemijski modificirani derivati CD stvaraju stabilnije komplekse izraženije topljivosti u odnosu na one s prirodnim CD.[69,71]

Tablica 3. Fizikalno-kemijske karakteristike farmaceutski najznačajnijih derivata CD.[69,72]

CD	Derivat CD	Prosječan broj supstituenata na molekuli CD	Molekulska masa (g mol^{-1})	Topljivost u vodi (mg mL^{-1})	Broj akceptora/donora vodika	Log $P_{o/v}$	Površinska napetost (mN m^{-1})
α-CD	Hidroksipropil-αCD (HPαCD)	3,6	1180	500	18/36	-	-
β-CD	Dimetil-βCD (DMβCD)	12-16	1225	570	7/35	–4,9	62
	Trimetil-βCD (TMβCD)	21	1430	310	0/35		56
	Hidroksietil-βCD (HEβCD)	3,6	1135	>20000	21/42	-	-
	Hidroksipropil-βCD (HPβCD)	2,8-10,5	1460	>1200	25/39	–11	54,8-57,5
	Sulfobutileter-βCD (SBEβCD)	12,6	1425	>1200	21/35	–10	71
γ-CD	Hidroksipropil-γ-CD (HPγCD)	3,0-5,4	1762	800	24/45	-	-
	Sulfobutileter-γ-CD (SBEγCD)	4-8	1578	>1200	-	–16	72,2

2.4.2. Mehanizam nastanka inkluzijskih kompleksa

U vodenim otopinama CD mogu graditi inkluzijske komplekse s mnogim lijekovima pri čemu se molekule vode smještene u centralnoj šupljini molekule CD zamjenjuju molekulom lijeka, ili češće samo nekim njezinim sterički kompatibilnim dijelom. Nastajanje kompleksa zavisi o polarnosti molekule lijeka te samo molekule koje su manje polarnosti od vode stvaraju inkluzijske komplekse. Pri tome, ne dolazi do nastajanja niti do kidanja postojećih kemijskih veza u molekuli lijeka, nego se uspostavlja dinamička ravnoteža između kompleksa i slobodnih reaktanata (Slika 7).[65,70,73] Ovaj proces je energetski povoljan te nastaje spontano.[68,69] U pravilu, kompleksi nastaju uklapanjem jedne molekule, ili njenog dijela u centralnu šupljinu jednog CD (kompleksi molarnog omjera 1:1), no moguće je i nastajanje kompleksa višeg reda, pri čemu se molekula lijeka uklapa u 2 ili više molekula CD.



Slika 7. Shematski prikaz nastajanja inkluzijskih kompleksa u ekvimolarnom omjeru lijeka i CD (A) ili u omjeru 1:2 (B).[68]

Nastajanjem inkluzijskog kompleksa mijenjaju se fizikalna, kemijska i biološka svojstva uklopljenog lijeka, pa tako CD mogu povećati oralnu i topikalnu bioraspoloživost lijekova, kemijski stabilizirati lijek te spriječiti njegovu enzimatsku razgradnju. U nekim slučajevima CD mogu utjecati i na permeabilnost lijekova kroz biološke membrane.[65,70] Nadalje, CD se koriste za modifikaciju agregatnog stanja, prevodeći plinovite, tekuće i lako hlapljive tvari u stabilne krutine.[74] Upotrebom CD može se također prekriti neugodan okus lijeka[75], te smanjiti

iritirajući učinak lijeka na sluznice.[76] Prikaz nekih od registriranih oblika lijekova baziranih na CD prikazani su u Tablici 4.[77]

Tablica 4. Pregled registriranih oblika lijekova razvijenih primjenom CD.[77]

Lijek/CD	Terapijska indikacija	Ljekoviti oblik	Zaštićeno ime
α-CD			
Alprostadil	Liječenje erektilne disfunkcije	Intravenozna otopina	Caverject Dual
β-CD			
Cetirzin	Antibakterijsko sredstvo	Tablete za žvakanje	Cetrizin
Deksametazon	Protuupalni steroid	Masti, tablete	Glymesason
Nikotin	Odvikavanje od pušenja	Sublingvalne tablete	Nicorette
Nimesulid	Nesteroidni protuupalni lijek	Tablete, čepići	Brexin
HPβCD			
Indometacin	Nesteroidni protuupalni lijek	Kapi za oko, otopina	Indocid
Itrakonazol	Antifungalno sredstvo	Oralna i intravenska otopina	Sporanox
Mitomicin	Citostatik	Intravenska infuzija	MitoExtra
SBEβCD			
Aripiprazol	Antipsihotik	Intramuskularna otopina	Abilify
Maropitant	Antiemetik (veterinarska primjena)	Parenteralna otopina	Cerenia
Vorikonazol	Antifungalno sredstvo	Intravenska otopina	Vfend
Ziprasidon mezilat	Antipsihotik	Intramuskularna otopina	Geodon
HPγCD			
Natrijska sol diklofenaka	Nesteroidni protuupalni lijek	Kapi za oko, otopina	Voltaren Ophtha
Tc-99 Teoboroksim	Dijagnostičko sredstvo	Intravenska otopina	CardioTec

Učinkovitost CD u povećanju topljivosti lijeka može se dodatno poboljšati pripremom ternarnih kompleksa. Polivinilpirolidon, hipromeloza, karboksimetilceluloza i polietilenglikol 400 (PEG 400) pokazali su se kao najučinkovitije ternarne komponente. Navedeni hidrofilni polimeri i CD stvaranjem ternarnih kompleksa dovode do značajnijeg povećanja topljivosti lijeka, u usporedbi s polimerom i CD zasebno, što je rezultat sinergističkog učinka između tih komponenti. Dokazano je da kompleksi CD i lijeka, kojima je dodan polimer topljiv u vodi mogu povećati bioraspoloživost uz smanjenje količine CD-a do 80%. Osim polimera, kao učinkoviti pojačivači solubilizacijskog učinka CD pokazale su se male organske kiseline kao limunska, vinska i jabučna te aminokiseline.[69,76] Može nastati nekoliko tipova interakcija između polimera i lijeka kao rezultat strukturne razlike i polariteta CD molekula, što može značajno promijeniti kemijsku stabilnost lijekova.[69]

2.4.3. Metode pripreme inkluzijskih kompleksa u čvrstom stanju

Glavne tehnike za pripremu inkluzijskih kompleksa u čvrstom stanju uključuju:

- metode u čvrstom stanju, poput mljevenja smjese u visokoenergetskim mlinovima, uporabom superktitičnih fluida (SCF) ili primjenom mikrovalnog zračenja
- metode u polučvrstom stanju, kao što je „gnječenje“ smjese u prisutnosti hlapljivog otapala ili zagrijavanjem u prisutnosti male količine vode
- metode u otopini, koje uključuju otapanje lijeka i CD u prikladnom otapalu ili sustavu otapala uz naknadno uklanjanje otapala različitim tehnikama kao što su uparavanje, sušenje smrzavanjem ili sušenje raspršivanjem ili izolacijom kompleksa iz otopine taloženjem

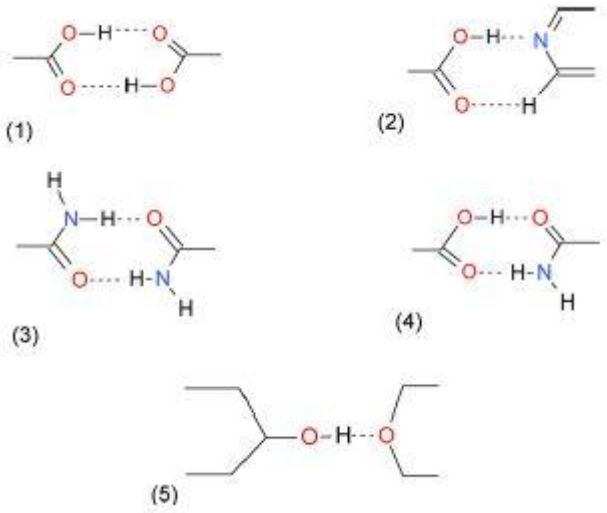
Pokazano je da tehnika koja se koristi za pripremu kompleksa u čvrstom stanju može znatno utjecati na stupanj interakcije između lijeka i CD, a time i na svojstva dobivenog produkta. Stoga je ključno pažljivo odabrati metodu pripreme kompleksa te optimirati procesne parametre kako bi interakcija između domaćina i „gosta“ bila što uspješnija.[78]

2.4.4. Primjena CD u povećanju topljivosti PZQ

U literaturi su opisani inkluzijski kompleksi PZQ s prirodnim derivatima ciklodekstrina (α-CD, β-CD i γ-CD). PZQ gradi najstabilnije inkluzijske komplekse s βCD (K_s = 396,91 mol^{-1} L), a pripremom liofiliziranog kompleksa PZQ s β-CD topljivost lijeka je povećana svega 5 puta.[79] Primjenom molekularne mehanike i ^{1}H-NMR spektroskopije određena je struktura nastalog kompleksa, koji nastaje inkluzijom izokinolinskog prstena lijeka u centralnu šupljinu β-CD[80]. Primjena PZQ u obliku inkluzijskog kompleksa s β-CD na miševima u dozi od 150 mg PZQ/kg rezultirala je eradikacijom 99% *S. mansoni*, dok je čisti lijek primijenjen u istoj dozi pokazao značajno manju učinkovitost, uz eradikaciju svega 59% parazita[81]. Novija istraživanja pokazuju da se pripremom ternarnih kompleksa PZQ s βCD i hipromelozom solubilizacijski potencijal ovog CD može još unaprijediti.[82] PZQ sa kemijski modificiranim derivatima βCD, naročito s HPβCD stvara stabilnije komplekse (K_s = 642 mol^{-1} L), a pripremom kompleksa PZQ i HPβCD u čvrstom stanju tehnikom liofilizacije ostvaren je porast brzine otapanja lijeka od 5,8 puta.[83] Sličnu topljivost pokazuje i kompleks PZQ s MβCD.[84] Novija istraživanja pokazuju da je primjenom CD moguće korigirati neugodan okus lijeka, a u tu svrhu se naročito učinkovitim pokazao HPβCD.[85]

2.5. Kokristali djelatnih tvari

Kokristali djelatnih tvari su višekomponentni supramolekulski sustavi građeni od nenabijenih farmakološki aktivnih molekula i farmakološki prihvatljivih molekula sučinitelja (koformera) u definiranom stehiometrijskom omjeru, koji nalaze sve značajniju primjenu u povećanju topljivosti i bioraspoloživosti teško topljivih lijekova. Uvođenjem odgovarajućih supramolekulskih sintona pomoću molekula koformera, kao što su karboksilne kiseline, amini, šećeri, alkoholi ili amino kiseline mijenjaju se interakcije između molekula koje su pakirane u kristalu, kao što su van der Waalsove sile, hidrofobne interakcije te vodikove i halogenske veze, što može rezultirati boljom topljivošću nastalog kokristala.[86] Za razliku od soli, prilikom nastajanja kokristala ne dolazi do prijenosa protona između kiseline i baze.[87] Najčešći supramolekulski sintoni koji se koriste u farmaceutskim kristalima prikazani su na Slici 8.[86] Homosinton karboksilne kiseline preko vodikove veze C=O---H-O vrlo je čest (1). Drugi vrlo često primjenjivan polimer homosinton je homodimer amida prikazan na slici 8 (3), tvoreći kokristal preko vodikove veze C=O--- H-N. Osim homosintona, neki heterosintoni također su prikazani na slici 8, kao što je karboksilna kiselina – piridin (2), karboksilna kiselina – amid (4) i alkohol – eter (5).



Slika 8. Tipični motivi vodikovih veza u kristalima.[86]

Nastajanjem kokristala mijenjaju se fizikalno-kemijska svojstva lijeka, bez utjecaja na farmakološku aktivnost djelatne tvari. Pri tome, dostupni podaci pokazuju da se nastajanjem kokristala temperatura taljenja produkta smanjuje u otprilike 39% opisanih slučajeva, a od

toga, u 51% slučajeva poprima vrijednost između temperature taljenja lijeka i koformera. Sniženje tališta kokristala u pravilu se može povezati s boljom topljivošću produkta te posljedično značajnim porastom oralne bioraspoloživosti lijeka.[88] Nadalje, nastajanje kokristala značajno poboljšava svojstvo močenja tvari, koje je ključno u procesu otapanja, a neka istraživanja pokazuju da se sintezom kokristala može poboljšati i permeabilnost lijekova kroz kožu, kao što je pokazano na primjeru kokristala aciklovira i jabučne kiseline.[89] Osim porasta topljivosti, pripremom kokristala može se ostvariti i poboljšanje kemijske stabilnosti lijeka kao i poboljšanje tehnoloških karakteristika tvari, kao što su svojstva tečenja i kompresibilnosti.[90] Pregled komercijalno dostupnih lijekova formuliranih kao kokristali prikazan je u Tablici 5.[91] Od navedenih lijekova, 80% ih pripada u II skupinu prema bifarmaceutskoj klasifikaciji lijekova koja uključuje tvari niske topljivosti, a dobre permeabilnosti.

Tablica 5. Pregled komercijalno dostupnih lijekova koji su formulirani kao kokristali.[91]

Zaštićeno ime	Datum odobrenja (FDA)	Komponente formulacije	Indikacija
Beta-Chlor	1963	Kloralnihidrat – betain	Smirenje
Depakote	1983	Valproična kiselina – valproat natrij	Epilepsija
Cafcit	1999	Kofein – limunska kiselina	Infantilna apneja
Lexapro	2002	Escitalopram oksalat – oksalna kiselina	Depresija
Suglat	2014	Ipragliflozin – L-prolin	Dijabetes
Entresto	2015	Valsartan natrij – sakubitril natrij	Zastoj srca
Odomzo	2015	Sonidegib monofasfat – fosforna kiselina	Karcinom bazalnih/osnovnih stanica
Steglatro	2017	Ertugliflozin – L-piroglutenska kiselina	Dijabetes

2.5.1. Načini pripreme kokristala

Kokristali se mogu pripremiti kristalizacijom iz otopine, kristalizacijom iz taline, mljevenjem reaktanata u čvrstom stanju, reakcijskom kristalizacijom te kristalizacijom iz suspenzije. U zadnjim godinama prisutan je trend značajnog porasta primjene mehanokemijskih metoda za sintezu kokristala.[10] U tom smislu naročito učinkovitim se pokazalo mljevenje potpomognuto malom količinom otapala.[92] Detaljniji opis primjene tehnika mljevenja u pripremi kokristala prikazan je u slijedećem poglavlju.

2.5.2. Kokristali s PZQ

U literaturi su opisani kokristali PZQ s nizom dikarboksilnih alifatskih kiselina homolognog niza HOOC−(CH_2)n−COOH, (*n* = 1-8). Dosadašnja istraživanja su uglavnom bila usmjerena na sintezu i fizikalno-kemijsku karakterizaciju kokristala PZQ, a njihov potencijal primjene u razvoju novih formulacija lijeka nije istraživan.[93]

2.6. Mljevenje kao ekološki prihvatljiva metoda sinteze čvrstih disperzija, inkluzijskih kompleksa i kokristala

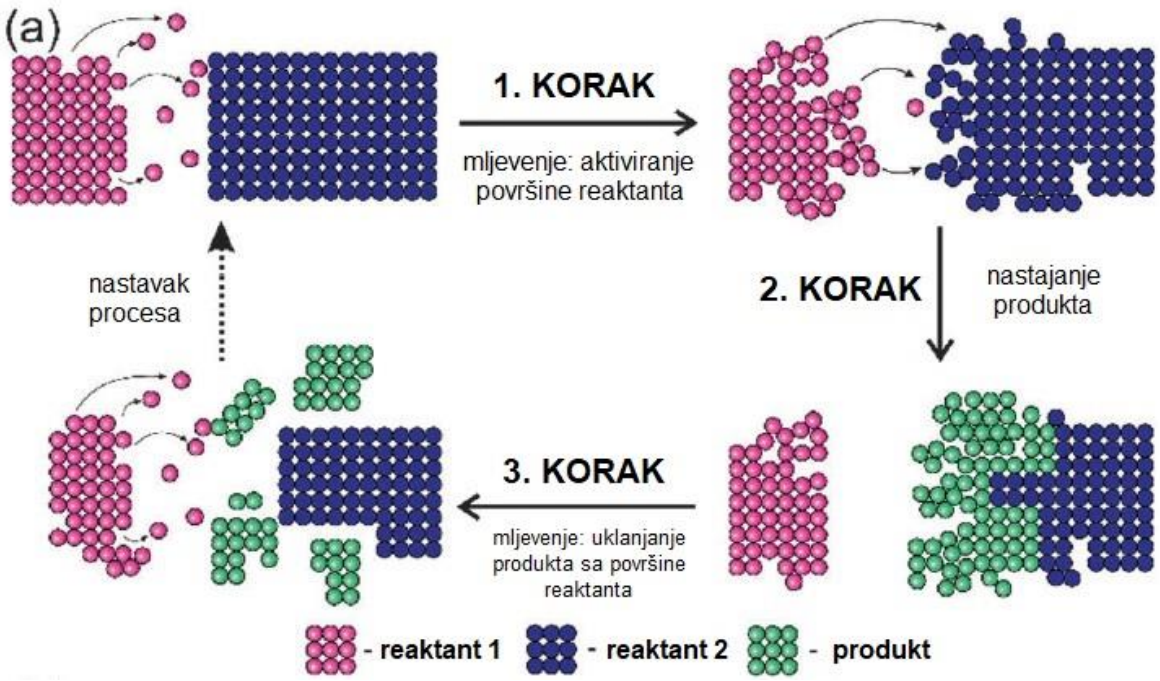
Konvencionalni postupci koji se rutinski koriste u farmaceutskoj industriji za pripremu polimernih disperzija, inkluzijskih kompleksa i kokristala obično uključuju uporabu velikih količina organskih otapala. Procjenjuje se da više od 85% kemikalija koje se koriste u farmaceutskoj industriji čine organska otapala. Popularnost ovog pristupa u pripremi produkata s povećanom topljivosti pripisuje se detaljnom poznavanju mehanizama i brzine reakcija u otopini koje omogućuju preciznu kontrolu prinosa i kvalitete ciljanog produkta. Međutim, taj pristup uključuje i nedostatke kao što su kompliciranа tehnologija i visoki troškovi zbrinjavanja toksičnih otapala koja mogu biti opasna za zdravlje zaposlenika i bolesnika, a štetno djeluju i na okoliš. Prisutni su i problemi vezani za uklanjanje otapala iz konačnog produkta.[94]

Alternativni pristup u sintezi navedenih produkata uključuje indukciju kemijskih reakcija među komponentama u čvrstom stanju primjenom mehaničke energije (tzv. mehanokemija). To se može postići usitnjavanjem reaktanata u tarioniku pistilom ili primjenom vibracijskih i planetarnih mlinova koji pružaju bolju kontrolu uvjeta mljevenja i bolju reproducibilnost samog postupka. Mljevenje se pokazalo uspješnom tehnikom za sintezu različitih supramolekulskih sustava u čvrstom stanju, uključujući polimerne disperzije, inkluzijske komplekse i kokristale.[9,86] Sam postupak je brz i učinkovit, a zahtjeva minimalnu uporabu otapala što ga čini ekološki prihvatljivim.[92,95]

Zahvaljujući tome, mehanokemija čini okosnicu zelene kemije, propulzivnog područja istraživanja koje je usmjereno na održavanje ravnoteže između primjene prirodnih resursa, ekonomskog rasta i očuvanja okoliša. Mehanokemijsku sintezu moguće je provesti u visokoenergetskim mlinovima. Mehanička energija primijenjena na materijal prilikom usitnjavanja u visoko energetskim vibracijskim mlinovima najprije dovodi do smanjenja veličine čestica do kritičnog praga, nakon čega slijedi amorfizacija lijeka. Daljnje izlaganje uzorka mehaničkoj energiji dovodi do njegove mehaničke aktivacije čineći ga sklonim kemijskoj reakciji u krutom stanju. Međutim, takvi aktivirani mljeveni produkti obično su nestabilni, zahtijevajući dodavanje najmanje jedne ili više komponenti u tretiranu smjesu kako bi se stabilizirao aktivirani oblik lijeka, s ciljem pripreme farmaceutski stabilnog proizvoda. Opisana tehnika je poznata kao suho mljevenje (engl. *neat grinding*, NG).[92] U nekim

slučajevima, dodavanje malih (katalitičkih) količina otapala potrebno je, kako bi se potaknula interakcija između lijeka i aditiva u postupku mljevenja, što rezultira većim iskorištenjem i sintezom produkta sa željenim svojstvima. Takva tehnika je poznata kao mljevenje uz dodatak otapala (engl. *liquid assisted grinding*, LAG). Obje tehnike mljevenja su vrlo svestrane, omogućujući pripremu različitih produkata, ovisno o vrsti aditiva koji se koriste.[92,95]

Mehanokemijske transformacije organskih molekula mogu se prikladno opisati pomoću trostupanjskog modela koji je iznio Kaupp, a koji uključuje aktivaciju čvrstih reaktanata, njihovu reakciju i kristalizaciju produkta. U takvom procesu, prijenos masa u mehanokemijskoj reakciji može se odvijati kroz plin, tekućinu, krutu fazu ili bilo koju njihovu kombinaciju (Slika 9).[10]



Slika 9. Shematski prikaz trostupanjskog modela mehanokemijskih transformacija postupkom mljevenja.[10]

2.6.1. Mljevenje uz dodatak otapala (LAG)

Metoda LAG naširoko se primjenjuje u razvoju čvrstih oblika lijekova, te je sad uspostavljena kao moćna tehnika probira i sinteze različitih supramolekulskih produkata, koja koristi katalitičku količinu tekućine za olakšavanje postupka sinteze tijekom mljevenja. LAG pokusi provode se u kugličnim mlinovima, opremljenim posudicama za mljevenje u kojima se nalaze kuglice odgovarajućih dimenzija. U pravilu, vrsta dodane tekućine nema ključnu ulogu na uspješnost sinteze. Na primjenu sinteze kokristala kofeina ili teofilina s L-vinskom kiselinom primjenom LAG, pokazalo se da ne postoji korelacija između topljivosti reaktanta u korištenom otapalu i ishoda reakcije. Konkretno, dok NG mljevenjem kofeina ili teofilina s L-vinskom kiselinom ne nastaju kokristali, 20 minuta LAG-a u prisutnosti 25 različitih tekućina lako je proizvelo očekivane kokristale. Međutim, takva neovisnost učinkovitosti kokristalizacije od topljivosti reaktanta, nestaje ako se mljevenje provodi uz povećane količine tekuće faze ili kokristalizacije iz otopine. U takvim uvjetima, nastajanje kokristala postaje sve teže za reaktante s vrlo različitim topljivostima. Stoga je uveden parametar η koji kvantitativno opisuje LAG reakcijske uvjete, a definiran je kao omjer dodane tekućine i težine čvrstih reaktanata te tipično izražen u μL mg^{-1}. Ovaj parametar omogućuje izravnu, kvantitativnu usporedbu kokristalizacije NG, LAG, suspenzije i otopine, što dovodi do formalne definicije LAG reakcijskih uvjeta koji odgovaraju vrijednosti η pri kojoj je reaktivnost neovisna o topljivosti reaktanta. Za kokristalizaciju kofeina ili teofilina s vinskom kiselinom, LAG je empirijski povezano sa η vrijednostima između 0 i 1 μL mg^{-1}. Unutar tog raspona, veće vrijednosti η dovode do brže sinteze kokristala. Po definiciji, NG odgovara η = 0 μL mg^{-1}.[10.92]

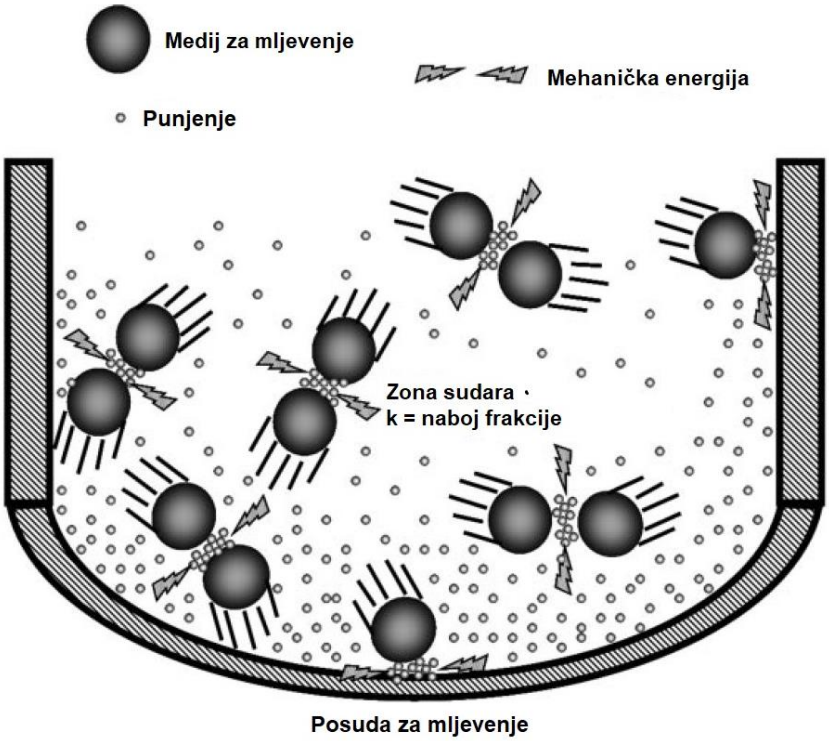
Toplinska energija koja se stvara tijekom LAG niža je od one kod NG jer su lijekovi suspendirani u organskoj i u vodenoj otopini. Pri tome, često se dodaju i modifikatori površine, koji uključuju različite polimere, kao što su PEG, HPC, HPMC, PVP, oligomere niske molekulske mase, prirodne produkte i surfaktante kao što su pluronic F68, pluronic F108 te lecitin. Temperatura reakcijske smjese tijekom obrade obično ne prelazi 40 °C.[10]

2.7. Mehanokemijska sinteza primjenom vibracijskog mlina

Vibracijski mikromlin je popularna tehnika za usitnjavanje krutina, a danas široku primjenu nalazi u sintezi polimernih disperzija, inkluzijskih kompleksa i kokristala.[96] Laboratorijski uređaji prikladni su za usitnjavanje uzoraka volumena od 0,2 do 20 mL. U osnovi, vibracijski mlin sadrži 2 posude punjene kuglicama različitih dimenzija (slika 10)[97]. Korištene količine kuglica i polaznog materijal ovise o volumenu posudica za mljevenje, a značajno utječu na intenzitet postupka mljevenja. Obično, posuda se puni kuglicama i polaznim materijalom do 50% odnosno 25% od ukupnog volumena posude.[9] Posude za mljevenje izvode oscilacije u horizontalnom položaju. Inercija kuglica u njima uzrokuje njihove visokoenergetske sudare s materijalom uzorka na zaobljenim krajevima posude za mljevenje. Također, pomicanje posuda za mljevenje u kombinaciji s pomicanjem kuglica rezultira intenzivnim miješanjem uzorka. Stupanj miješanja može se još više povećati korištenjem većeg broja kuglica manjeg opsega (slika 11).[95] Posude za mljevenje obično su opremljene teflonskom brtvom koja spriječava gubitak tekućina i čestica čak i pri mljevenju na visokim frekvencijama, što uređaj čini pogodnim i za LAG.[9] Tijekom samog mljevenja uzorak se minimalno zagrijava, pa se postupak uglavnom provodi pri sobnoj temperaturi, bez hlađenja.



Slika 10. Laboratorijski vibracijski mikromlin [97]



Slika 11. Shematski prikaz procesa unutar posude za mljevenje tijekom mljevenja. Medij za mljevenje prenosi mehaničku energiju na krutinu u obliku pulsa, jer u svakom sudaru sudjeluje samo mali dio ukupnog naboja.[95]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Kao djelatna tvar korišten je (±) prazikvantel (PZQ) (Genera d.d., Hrvatska). Aditivi korišteni pri mljevenju u ovoj studiji uključuju α-laktozu monohidrat (LMH, GranuLac 200, Meggle Wasserburg GmbH & Co.KG, Njemačka), povidon (PVP, Kollidon 25) i kopovidon (CPVP, Kollidon VA64), oboje od BASF SE (Njemačka) kao i hipromelozu niske viskoznosti (HPMC 4 mPa, Methocel E5 Premium EP, Colorcon, England) i hipromelozu visoke viskoznosti (HPMC 4000 mPa, Metolose 90 SH; Shin-Etsu Chemical Co, Ltd, Japan).

Za pripremu inkluzijskih kompleksa upotrebljen je prirodni derivat, β-ciklodekstrin (βCD, Cawamax® W7 Pharma), a od polusintetskih derivata korišteni su hidroksipropil-β-ciklodekstrin (HPβCD, Cavasol W7 HP Pharma), nasumično metilirani-β-ciklodekstrin (MEβCD, Cavasol W7 M Pharma) te natrijeva sol sulfobutileter-β-ciklodekstrina (SBEβCD, Captisol®). Molekulske mase korištenih ciklodekstrina iznosile su 1135 g mol^{-1} za βCD (Cavamax® W7), 1500 g mol^{-1} za HPβCD, 1331 g mol^{-1} za MEβCD te 2146 g mol^{-1} za SBEβCD (Captisol®).

Organske kiseline koje su korištene uključuju salicilnu kiselinu (SK), monohidrat limunske kiseline (LK), DL-jabučnu kiselina (JK) i L-(+)-vinsku kiselina (VK), koje su nabavljene od Sigma-Aldrich (SAD). Simulirani želučani medij pH 1,2; simulirani duodenalni medij pH 4,5 i simulirani crijevni medij pH 6,8, svi bez enzima, pripremljeni su prema monografiji 5.17.1 važeće Europske farmakopeje.

3.2. Priprema binarnih i ternarnih mljevenih uzoraka PZQ-a

Kruti binarni i ternarni produkti PZQ-a s različitim aditivima pripremljeni su mljevenjem njihove odgovarajuće smjese u visoko-energetskom vibracijskom mikromlinu (Mixer Mill MM 200, Retch, GmbH, Njemačka) pri sobnoj temperaturi. Za pripremu polimerne disperzije, odvagano je 100 mg PZQ i 100 mg pojedinog polimera. Prvo se smjesa supstancija izmješala u tarioniku špatulom, a zatim je stavljena u posude za mljevenje od 10 mL izrađene od nehrđajućeg čelika, koje su sadržavale 2 kuglice za mljevenje od istog materijala promjera 7 mm. Smjesa je mljevena 30 min pri 24 Hz.

Kokristali sa odabranim kiselinama pripremljeni su suhim mljevenjem (NG) kao i mljevenjem uz dodatak otapala (LAG). Smjesa 150 mg PZQ i ekvimolarna količina odabrane organske kiseline mljevena je kao što je opisano ranije, sa ili bez dodatka 15 μL koncentriranog etanola. Binarni kompleksi PZQ-a sa ciklodekstrinima i ternarni kompleksi sa odabranim ciklodekstrinima i organskim kiselinama pripremljeni su suhim mljevenjem (NG) na 24 Hz tijekom 30 minuta, u ekvimolarnim omjerima aditiva. U svim slučajevima, količina uzorka bila je oko 200 mg. Za procjenu učinka primijenjenog postupka na uzorke PZQ-a u čvrstom stanju, i sam lijek (PZQ) također je podvrgnut mljevenju pod istim uvjetima. Smjese su pripremljene prije mljevenja uz lagano miješanje PZQ-a i odabranog aditiva u određenom omjeru, u tarioniku sa lopaticom, neposredno prije upotrebe. Dobiveni produkti (uzorci) pohranjeni su u eksikatoru na sobnoj temperaturi.

3.3. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)

Termogrami DSC-a snimljeni su korištenjem uređaja Perkin-Elmer DSC 7 (USA). Mjerenja su provedena u atmosferi dušika nakon kalibracije uređaja indijem (čistoća 99.98 %; talište 156.61 °C i ΔH_{fus}=28,71 J g^{-1}). Uzorci (2-5 mg) odvagnuti su u aluminijske posudice, a termogram je snimljen pri brzini zagrijavanja od 10 °C min^{-1} u temperaturnom rasponu od 30 do 200 °C. Udio kristalinične frakcije lijeka u uzorcima (engl. *relative drug cristallinity*, RDC) izračunat je prema jednadžbi (1):

$$RDC = \frac{\Delta H_{uzorak}}{\Delta H_{lijek}} \times 100\%$$

gdje su ΔH_{uzorak} i ΔH_{lijek} izmjerene vrijednosti entalpije taljenja lijeka za uzorak i kristalinični lijek, normirane s obzirom na sadržaj lijeka u uzorku. Mjerenja su rađena u triplikatu, a relativna standardna devijacija kristaliničnosti je < 2,5 %.

3.4. Rentgenska difrakcija praškastog uzorka (XRPD)

Difraktogrami praškastih uzoraka snimljeni su na rentgenskom difraktometru Philips PW1750 (Philips Electronic Instruments, Nizozemska). Izvor zračenja bila je rentgenska cijev s bakrenom anodom i valnim duljinama izlaznog snopa rentgenskog zračenja $\lambda(K\alpha_1)$ = 1,54056 Å i λ ($K\alpha_2$) = 1,54439 Å. Omjer intenziteta $K\alpha_1/K\alpha_2$ iznosio je 0,5. Radni napon cijevi iznosio je 40 kV, a katoda je grijana strujom jakosti od 40 mA. Difraktogrami su snimani u području 2θ od 3° do 40°. Korak pomicanja brojača bio je 0,02° uz vrijeme zadržavanja i zapisivanja intenziteta na pojednom koraku u trajanju 0,2 s. Kao nosači uzoraka korištene su staklene pločice. Za upravljanje difraktometrom i prikupljanje podataka korišten je programski paket Philips X'Pert.

3.5. Infracrvena spektroskopija (FTIR)

FTIR spektri snimljeni su korištenjem Bruker Equinox 55 interferometra transmisijskom metodom te metodom prigušene totalne refleksije (engl. *attenuated total reflection,* ATR). Snimanje transmisijskom metodom provedeno je korištenjem KBr pastila koje su pripremljene miješanjem 1 mg krutog uzorka i 100 mg KBr u ahatnom tarioniku i komprimirane hidrauličnom prešom uz tlak od 10 kN cm^{-2}. Spektri su snimljeni u mjernom području između 4000 i 400 cm^{-1} uz rezoluciju od 4 cm^{-1}. ATR spektri snimljeni su korištenjem PIKE MIRacle ATR instrumentalnog dodatka s dijamantom kao internim refleksijskim elementom i optičkim komponentama od cinkonijevog selenida u mjernom području između 4000 do 600 cm^{-1} pri rezoluciji od 4 cm^{-1}. Za svaki spektar prikupljene su 32 snimke, a snimanje je provedeno pri sobnoj temperaturi. Snimljeni spektri obrađeni su primjenom funkcije proširene ATR korekcije, algoritma koji je uključen u OPUS 6.0 programski paket.

3.6. Ispitivanje topljivosti

Topljivost pripremljenih binarnih i ternarnih sustava PZQ ispitana je u simuliranom želučanom pH 1,2; simuliranom duodenalnom pH 4,5 i simuliranom crijevnom pH 6,8 mediju, bez enzima, dodavanjem suviška pripremljenog uzorka u 25 mL određenog otapala. Tikvice sa tako pripremljenim uzorcima su hermetički zatvorene i izložene blagom miješanju pri sobnoj temperaturi tijekom 24 sata. Nastajanje zasićene otopine potvrđena je prisustvom neotopljene krutine, što je provedeno vizualnim promatranjem tikvica s uzorcima. Nakon toga sakupljeni su alikvoti otopine koji su filtrirani koristeći 0,45 μm Millipore membranski filter. Preliminarnim studijama je potvrđeno da se PZQ ne apsorbira na korištene filtere. Koncentracija PZQ-a u filtratu određena je metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC), postupkom koji je opisan u odjeljku 3.10.

3.7. *In vitro* oslobađanje lijeka

In vitro oslobađanje lijeka iz pripremljenih uzoraka ispitano je primjenom metode s lopaticama koristeći Agilent 708-DS uređaj (Agilent Technologies, USA). Količina uzorka koja je sadržavala 20 mg PZQ-a dodana je u 500 mL medija za otapanje termostatiranog na 37 °C. Brzina miješanja podešena je na 50 okretaja u minuti. U ispitivanju su korišteni mediji za oslobađanje koji simuliraju želučani (pH 1,2) i crijevni (pH 6,8) medij, a pripremljeni su prema uputama važeće Europske farmakopeje. U određenim vremenskim intervalima uzimani su alikvoti uzorka koji su odmah bili nadomješteni jednakim volumenom medija za oslobađanje termostatiranog na istu temperaturu da bi se volumen održao konstantnim tijekom cijelog pokusa. Alikvoti su profiltrirani (0,45 μm Milipore membranski filtar), a količina lijeka u sakupljenim alikvotima određena je HPLC-om. Provedena je korekcija kumulativne mase oslobođenog lijeka do koje je došlo zbog dodatka svježeg medija u sustav.

Izračunata je učinkovitost oslobađanja nakon 60 minuta, (engl. *dissolution efficiency*, $DE_{60\text{min}}$) koja je definirana omjerom površine ispod krivulje koja prikazuje količinu oslobođenog lijeka (Q) u vremenu (t) i površine pravokutnika čija visina iznosi 100% oslobođene količine lijeka (Q) u istom vremenskom intervalu.[98] Učinkovitost oslobađanja izražena je kao postotak i izračunata je prema izrazu (2):

$$DE_{60\,min} = \frac{\int_0^t Q dt}{Q_{100\%} \times t} \times 100 \qquad (2)$$

gdje *je Q* postotak otopljenog lijeka, a *t* odgovarajuće vrijeme otapanja.

3.8. Ispitivanje kemijske stabilnosti

Kemijska stabilnost PZQ u odabrani uzorcima sa odgovarajućim profilima otapanja ispitana je metodom ubrzanog starenja. Odabrani čvrsti uzorci pohranjeni su u otvorenim bočicama u klima-komoru za ispitivanje stabilnost (Binder KBF 720 Constant Climate Chambers, Germany), na 40 ± 2 °C i 75 ± 5% relativne vlage tijekom tri mjeseca. U unaprijed određenim vremenskim intervalima sakupljeni su alikvoti uzoraka u kojima je primjenom HPLC određena količina PZQ. Za ispitivanje fotostabilnosti, odabrani uzorci su naneseni u tankom sloju debljine 1 mm u petrijeve zdjelice i izloženi UV zračenju u dozi od 1 200 000 Lux/h i 200 Wh/m^2 u fotostabilnoj komori 5 (Binder KBF ICH 720 Constant Climate Chambers with ICH conform illumination, Germany). Preostala količina lijeka u tretiranim uzorcima određena je nakon 7 dana pomoću HPLC-a.

3.9. Uvjeti uzgoja stanica

Korištena je stanična linija humanog kolorektalnog karcinoma Caco-2 stanice (American Type Culture Collection [ATCC] Rockville, MD, USA). Imortalizirane stanice uzgajaju se u tikvicama za uzgoj stanica u inkubatoru pri temperaturi 37 °C, relativnoj vlažnosti zraka od 95% i s 5% CO_2. Stanice rastu u hranidbenom mediju DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) koji sadrži pufer balansiran Hankovim solima (engl.*Hank's Balanced Salt Solution*, HBSS) koji je pripravljen otapanjem 0,0463 g $CaCl_2 \times 2H_2O$, 0,0250 g $MgCl_2 \times 6H_2O$, 0,0250 g $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0,1 g KCl, 0,015 g KH_2PO_4, 0,0875 g $NaHCO_3$, 2 g NaCl, 0,015 g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$, 0,275 g D-Glukoza monohidrata i 1,7875 g HEPES-a u 250 mL pročišćene vode, a pH je podešen na 7,4 korištenjem otopine NaOH koncentracije 10×10^{-3} mol L^{-1}. Osim toga, hranidbeni medij sadrži i L-glutamin, natrij bikarbonat i neomicinom (Imunološki zavod d.d., Hrvatska) uz dodatak 10% fetalnog goveđeg seruma (GIBCO, Invitrogen, UK). Svaka dva dana stanicama se mijenja hranidbeni medij. Postizanjem konfluentnosti stanica, uklanja se medij u kojem su dosad stanice rasle te se primjenom otopine koja sadrži 0,25% tripsin i 0.20% etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) stanice odvajaju od površine na kojoj su rasle. Stanice se odvajaju od medija centrifugiranjem pri brzini od 1200 rpm (Heraeus Megafuge 1.0) te resuspendiraju u svježem hranidbenom mediju. Broj stanica po mL medija određuje se brojanjem hemocitometrom, a pripremljena disperzija stanica se nasađuje na ploče za uzgoj stanica.

3.9.1. Ispitivanje citotoksičnosti na kulturi Caco-2 stanica

Za procjenu potencijalne citotoksičnosti PZQ-a i odabranog mljevenog uzorka, kultura Caco-2 stanica je nasađena na ploče sa 24 jažice (Sarstedt, Newton, NC, USA) pri gustoći od 10^5 stanica/cm^2 te uzgajana u hranidbenom mediju DMEM 2 dana do postizanja konfluencije. Matična otopina PZQ-a (1×10^{-3} mol L^{-1}), pripremljena je otapanjem lijeka u manjem volumenu dimetilsulfoksida (DMSO), a zatim nadopunjena do zadanog volumen sa HBSS-om. Konačna koncentracija DMSO u matičnoj otopini PZQ-a iznosila je 1% (w/v). Odabrani mljeveni uzorak i odgovarajući ciklodekstrin otopljeni su direktno u HBSS-u u 1×10^{-3} mol L^{-1} koncentraciji. Pripremljene matične otopine tada su razrijeđene dodatkom HBSS-a, čime je priređen niz testnih otopina u kojima je koncentracija ispitivanih supstancija iznosila 0,1, 0,3 i $0{,}5\times10^{-3}$ mol L^{-1}. Prije tretiranja stanica sa pripremljenim otopinama, hranidbeni medij je uklonjen, i zamijenjen sa HBSS-om ili pripremljenim otopinama uzorka. Stanice su tretirane uzorcima tijekom 2 sata, nakon čega je stanična vijabilnost ispitana MTT testom, koji mjeri aktivnost mitohondrijskog enzima sukcinil-dehidrogenaze. Stanične sukcinil dehidrogenaze reduciraju MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolij-bromid, Sigma) u ljubičasto obojeni produkt, formazan. Nastali produkt je netopljiv u vodi, ali se otapa u organskom otapalu (izopropanol) te se određuje apsorbancija izopropanolne otopine formazana pri 570 nm (1420 Multilabel counter Victor, Perkin Elmer, SAD). Apsorbancija formazana proporcionalna je broju metabolički aktivnih stanica.[14] U ovom eksperimentu, netretirane stanice inkubirane u HBSS-u korištene su kao negativna kontrola.

Nakon 2 h tretiranja sa odabranim uzorcima, HBSS koji sadrži ispitivane uzorke je uklonjen, a stanice su isprane dva puta s PBS-om i inkubirane u svježem hranidbenom mediju (100 µl/jažici) tijekom 24 h. Nakon toga, u svaku jažicu je dodano 10 µL MTT otopine (5 mg/ml), a stanice su zatim inkubirane 1 sat na 37 °C, nakon čega je hranidbeni medij uklonjen, a stanice su lizirane i formazan je otopljen dodatkom 100 µL izopropanola te je izmjerena apsorbancija na 570 nm koristeći mikrotitarski čitač ploča. Vijabilnost stanica određena je prema jednadžbi (3):

$$vijabilnost\ (\%) = \frac{\bar{A}\ (stanice\ tretiranje\ HSSB-om)}{\bar{A}\ (stanice\ tretirane\ otopinom\ uzorka)} \times 100 \qquad (3)$$

pri čemu $\bar{A}$ predstavlja srednju vrijednost apsorbancija izmjerenih za stanice koje su tretirane HSSB-om (kontrola) ili otopinom uzorka u HSSB-u.

3.9.2. *Ispitivanje permeabilnost na Caco-2 staničnom monosloju*

Caco-2 stanice nasađuju se na polikarbonatnu membranu veličina pora 0,4 μm, promjera 12 mm i površine 1,12 cm^2 (Transwell®, Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Nizozemska) koja je prethodno obložena kolagenom i fibronektinom. Gustoća stanica je iznosila 2.5×10^4 stanica/po jažici. Stanice se uzgajaju uz često mijenjanje hranidbenog medija (svaki drugi dan tijekom prvih 10 dana, a nakon toga svaki dan) uz mjerenje transepitelnog električnog otpora (TEER) korištenjem STX-2 elektropde i EVOM voltametra (WPI Inc., Sarasota, Florida, USA), čime se pratio proces rasta staničnog monosloja te njegov integritet tijekom eksperimenta. Za ispitivanje permeabilnosti korišteni su konfluentni monoslojevi koji su formirani 20-22 dana nakon nasađivanja stanica na polikarbonatnu membranu. Neposredno prije nanošenja uzorka, hranidbeni medij je uklonjen, monoslojevi su isprani HBSS-om te je u donorski i akceptorski odjeljak ploče dodano 400, odnosno 1200 μL HBSS-a. Tako pripremljene ploče inkubirane su tijekom slijedećih 30 minuta. Nakon toga je HBSS iz donorskog odjeljka uklonjen i zamijenjen s 400 μL otopine ispitivanih uzoraka u HBSS-u u koncentraciji 0.1×10^{-3} mol L^{-1}, koji su priređeni kao što je opisano u odjeljku 2.9.1. U unaprijed određenim vremenskim intervalima tijekom 2 sata ispitivanja sakupljani su alikvoti HBSS-a iz akceptorskog odjeljka volumena 400 μL koji su odmah nadomiještani istim volumenom svježeg HBSS-a. Na kraju ispitivanja sakupljen je i alikvot volumena 300 μL iz donorskog odjeljka. Za svaki od ispitivanih uzoraka mjerenje je provedeno u triplikatu, pri pH 7,4, temperaturi od 37 °C, u atmosferi s 5% CO_2 i relativne vlažnosti 95%.

Sakupljeni uzorci razrijeđeni su acetonitrilom da bi se dobio volumni omjer vode prema acetonitrilu 45:55, a zatim je količina PZQ-a u uzorcima određena HPLC-om. Prividni koeficijenti permeabilnosti lijeka kroz Caco-2 stanični monosloj (P_{APP}) za ispitivane uzorke izračunati su prema slijedećoj jednadžbi:

$$P_{APP} = \frac{\partial Q}{\partial t} \times \frac{1}{A \times c_0} \quad (4)$$

gdje je $\partial Q/\partial t$ brzina permeacije, A je površina difuzije monosloja i c_0 je početna koncentracija lijeka u donorskom odjeljku.[99]

3.10. HPLC analiza prazikvantela

Kvantitativno određivanje PZQ-a provedeno je pomoću Agilent 1290 Infinity II LC sustava opremljenog LiChrospher® 100 RP-18 (5 μm) LiChroCART® 250-4 kolonom (Merck Milipore, Njemačka) pri temperaturi od 25 °C. Pokretna faza sastojala se od smjese acetonitrila i vode u volumnom omjeru 45:55, uz protok od 1 mL/min. Volumen injektiranja iznosio je 20 μL pri analizi uzoraka sakupljenih tijekom ispitivanja topljivosti, *in vitro* oslobađanja lijeka i ispitivanja stabilnosti. Za analizu lijeka u uzorcima sakupljenim tijekom ispitivanja permeabilnost na Caco-2 staničnom monosloju, volumen injektiranja povećan je na 100 μL. Prazikvantel je detektiran pomoću UV zračenja pri 210 nm. Vrijeme zadržavanja iznosilo je 9 minuta.

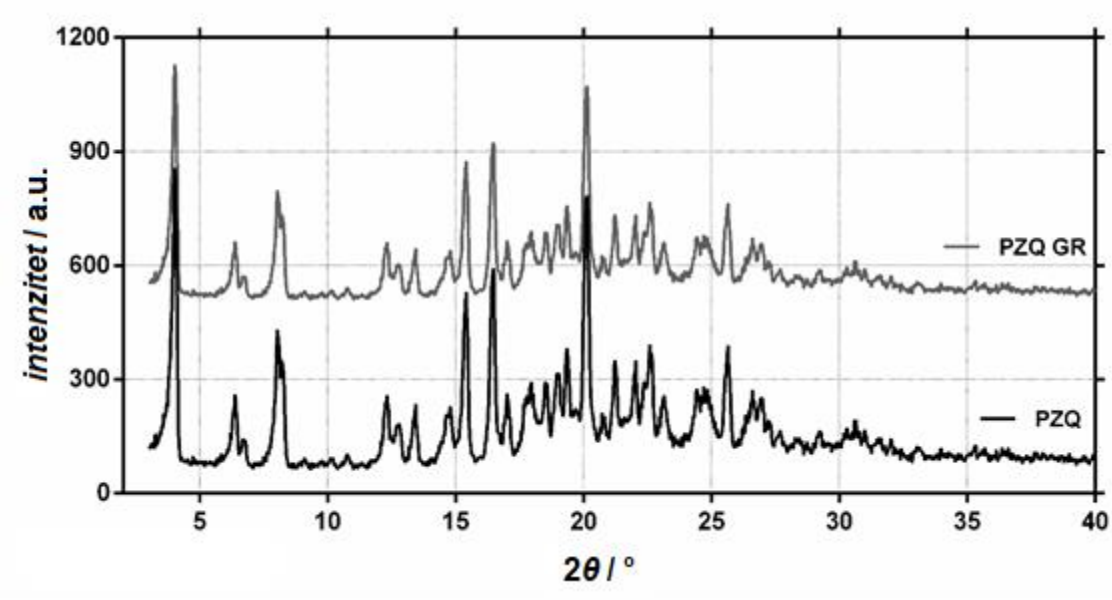
3.11. Statistička analiza

Sve vrijednosti izražene su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija n nezavisnih mjerenja. Podaci su obrađeni primjenom testa analize varijance (ANOVA) uz razinu statističke značajnosti $p<0,05$. Za statističku obradu podataka korišten je programski paket Prism GraphPad (GraphPad Software, Inc., San Diego, SAD; www.graphpad.com).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Utjecaj mljevenja na fizikalno-kemijske karakteristike lijeka

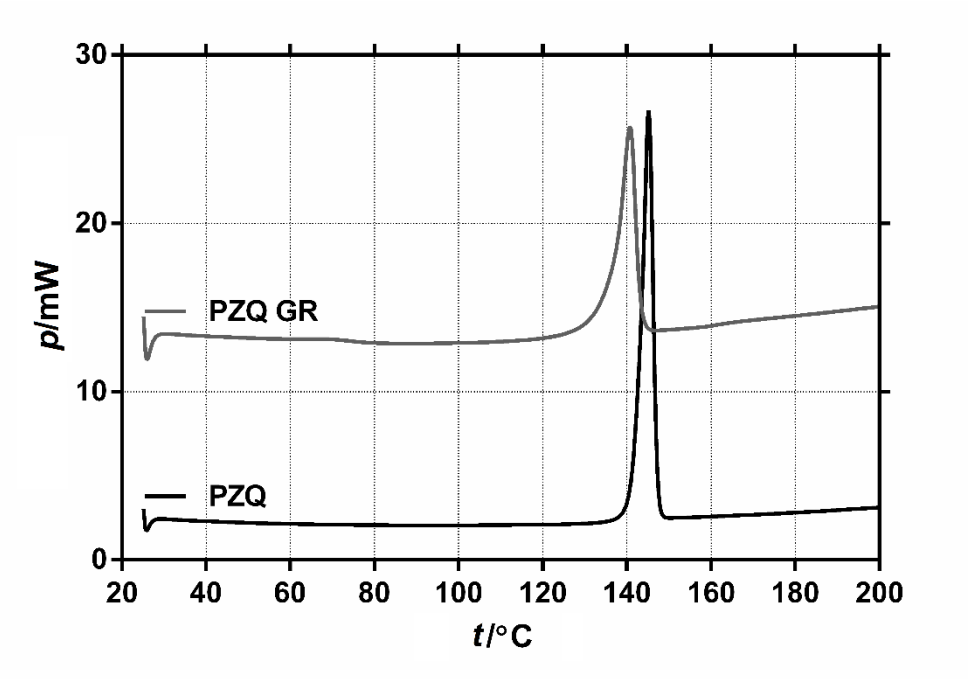
Mehanokemija je prepoznata kao vodeća ekološki prihvatljiva tehnologija prikladna za pripremu čvrstih disperzija i inovativnih supramolekularnih sustava kao što su kokristali ili inkluzijski kompleksi.[100] Prvi korak u razvoju takvih sustava je procijeniti učinak mljevenja na fizičko-kemijska svojstva lijeka. U tu svrhu, PZQ je podvrgnut suhom mljevenju, a tako pripremljeni uzorak karakteriziran je primjenom XRPD, DSC i FTIR analize (Slike 12-14). Također je određen utjecaj mljevenja na topljivost lijeka, a rezultati prikazani u tablici 6.



Slika 12. XRPD difraktogram nativnog lijeka (PZQ) i uzorka lijeka nakon mljevenja tijekom 30 minuta (PZQ GR)

U XRPD difraktogramu nativnog uzorka lijeka (Slika 12) mogu se uočiti pikovi visokog intenziteta pri vrijednostima kuta difrakcije od 4.01°, 15.42°, 16.74° i 20.09°, kao i neki sekundarni pikovi koji su tipični za racemičnu smjesu PZQ.[2,101] Difraktogram PZQ podvrgnutog suhom mljevenju bez dodataka aditiva za mljevenje usporediv je se difraktogramom nativnog PZQ-a. U DSC termogramu istog uzorka (Slika 13) vidljiv je oštar endotermi pik pri 142.28 °C, što odgovara temperaturi taljenja lijeka, a vrijednosti tališta i

entalpije taljenja (Tablica 6) tipične su za racemičnu smjesu PZQ.[2,101] Međutim, u termogramu mljevenog uzorka (PZQ GR), pik asigniran taljenju lijeka nalazi se pri nešto nižoj temperaturi, uz smanjenu entalpiju taljenja (Tablica 6), što upućuje na djelomičnu amorfizaciju lijeka od oko 19% tijekom postupka mljevenja.



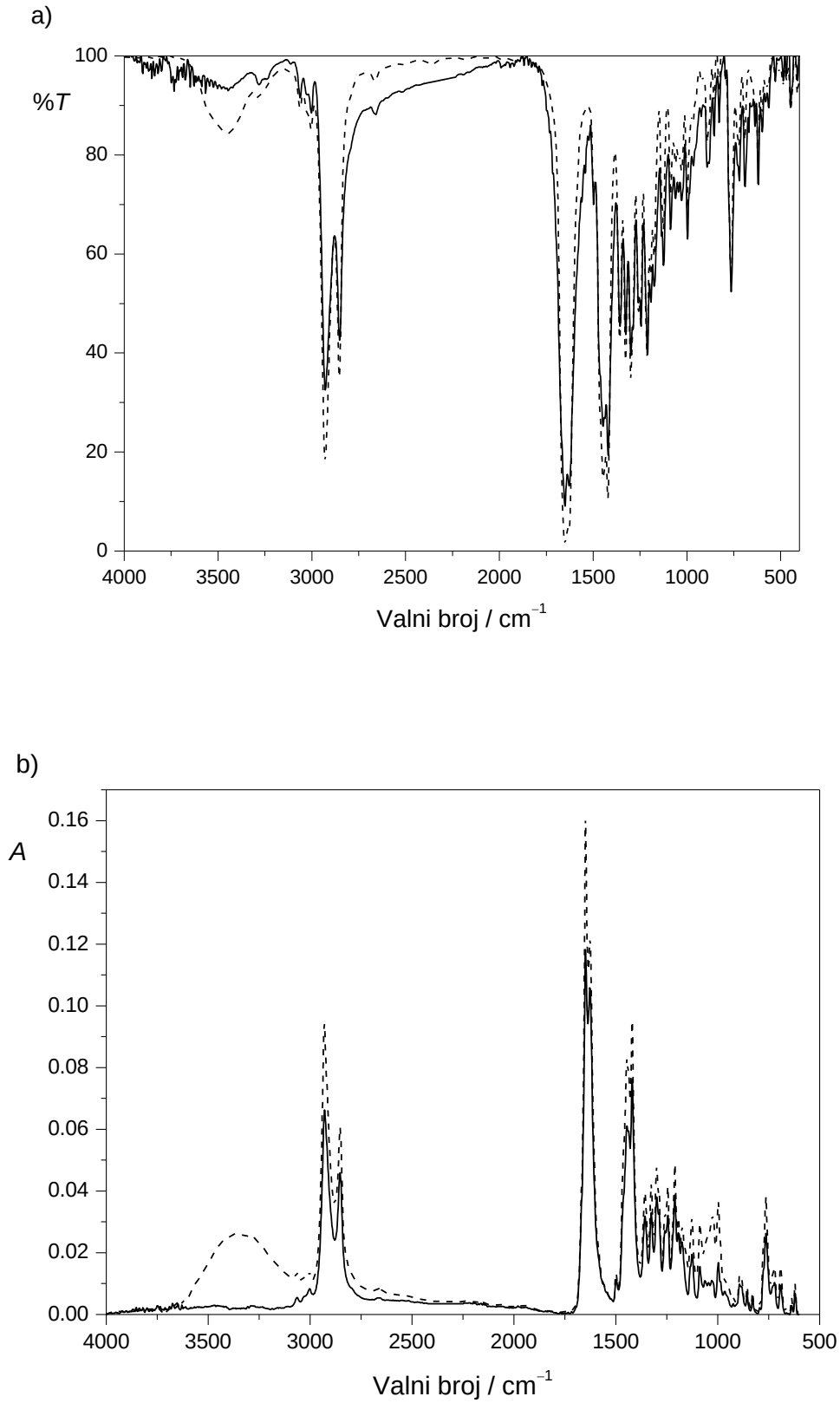
Slika 13. DSC termogrami nativnog lijeka (PZQ) i uzorka lijeka nakon mljevenja tijekom 30 minuta (PZQ GR).

Kako bi se odredile potencijalne promjene uzoraka prazikvantela uzrokovane postupkom mljevenja primjenjena je FTIR spektroskopija. Snimljeni su IR spektri mjerenjem transmisije, odnosno prigušene totalne refleksije (Slika 14). Iz prikazanih podataka vidljivo je da mljevenje nije utjecalo na strukturnu organizaciju PZQ kristala, s obzirom da su spektri za nativni i mljeveni uzorak identični. U konačnici, postupak mljevenja lijeka bez dodataka aditiva nije značajno utjecao na njegovu topljivost u umjetnom želučanom, duodenalnom i crijevnom mediju ($p < 0,05$; Tablica 6). Navedeni podaci nedvojbeno ukazuju da je za značajnije povećanje topljivosti PZQ postupak mljevenja potrebno provesti korištenjem odgovarajućeg aditiva. U tu svrhu, u nastavku rada korišteni su različiti polimeri uobičajeni u farmaceutskoj praksi, organske kiseline te ciklodekstrini.

Tablica 6. Sastav i fizikalno-kemijska svojstva pripremljenih uzoraka PZQ: talište lijeka (T), entalpija taljenja PZQ (ΔH_{fuz}), relativna kristalnost uzorka (RDC) i topljivost (s_0) u umjetnom želučanom (pH 1,2), duodenalnom (pH 4,5) i crijevnom mediju (pH 6,8).

Uzorak	Aditiv u postupku mljevenja	Omjer lijeka i aditiva	Način pripreme	T (PZQ)/°C	ΔH_{fuz}(PZQ)/Jg^{-1}	RDC (%)	s_0 /mg mL^{-1}		
							pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8
PZQ	-	-		142,28	92,33	100,00	0,219*		
PZQ GR	-	-	NG	136,34	74,73	80,94	0,220*		
PZQ/LMH	laktoza monohidrat	1:1 maseni omjer		134,86	29,66	59,86	0,225*		
PZQ/HPMC 4	hipromeloza niske viskoznosti			135,53	6,85	14,83	0,284*		
PZQ/HPMC 4000	hipromeloza visoke viskoznosti			135,08	7,02	15,20	0,296*		
PZQ/PVP	povidone			132,98	9,88	21,41	0,306*		
PZQ/CPVP	kopovidone			130,94	9,49	20,55	0,279*		
PZQ/LK	limunska kiselina	1:1 molarni omjer	LAG	-	-	nova čvrsta faza	0,296	0,325	0,300
PZQ/JK	jabučna kiselina			-	-	nova čvrsta faza	0,390	0,464	0,405
PZQ/SK	salicilna kiselina			-	-	nova čvrsta faza	0,142	0,375	0,337
PZQ/VK	vinska kiselina			-	-	nova čvrsta faza	0,307	0,346	0,316
PZQ/βCD	β- ciklodektrin	1:1 molarni omjer	NG			61,63	0,412*		
PZQ/HPβCD	hidroksipropil-β-ciklodektrin			-	-	amorfni produkt	0,480*		
PZQ/MEβCD	nasumično metilirani-β-ciklodekstrin			-	-	amorfni produkt	0,519*		
PZQ/SBEβCD	sulfobutil-β-ciklodekstrin			-	-	amorfni produkt	0,460*		
PZQ/HPβCD/JK	hidroksipropil-β-ciklodektrin i jabučna kiselina	1:1:1 molarni omjer		-	-	amorfni produkt	0,447*		
PZQ/MEβCD/JK	nasumično metilirani-β-ciklodekstrin i jabučna kiselina			-	-	amorfni produkt	0,476*		

* Razlike u topljivosti PZQ u ispitivanim medijima nisu statistički značajne ($p>0,05$). Vrijednosti standardnih devijacija nisu prikazane radi bolje preglednosti. U svim slučajevima relativna standardna devijacija je manja od 1%.

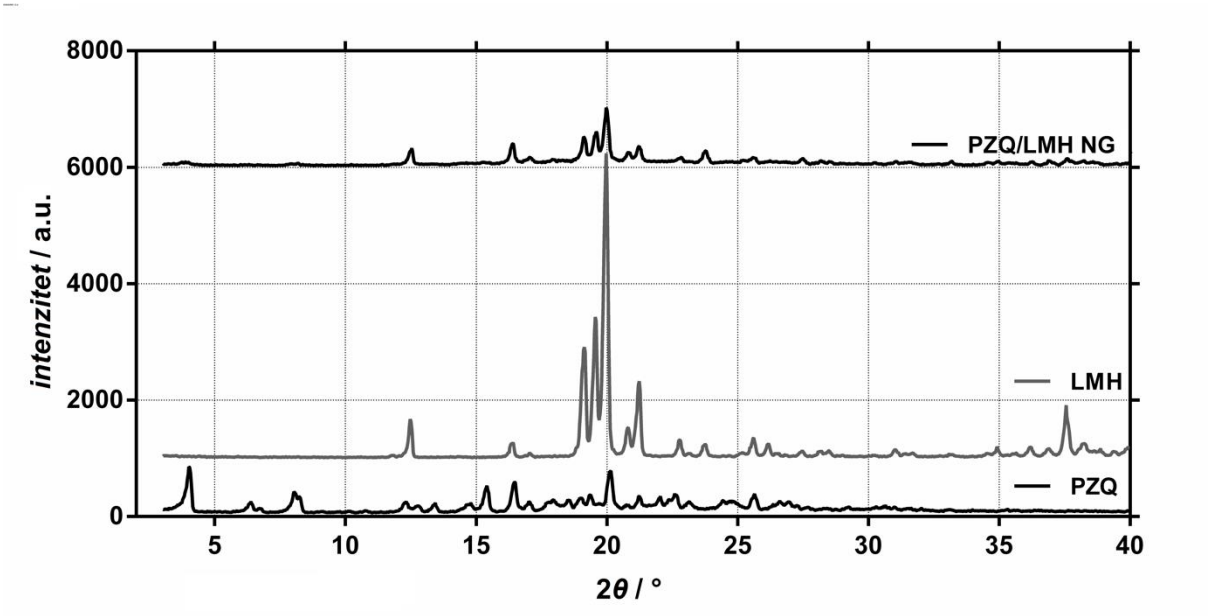


Slika 14. IR spektri PZQ prije (-----) i nakon (——) suhog mljevenja. Transmisijski spektri (a) i spektri snimljeni tehnikom prigušene totalne refleksije (ATR) (b).

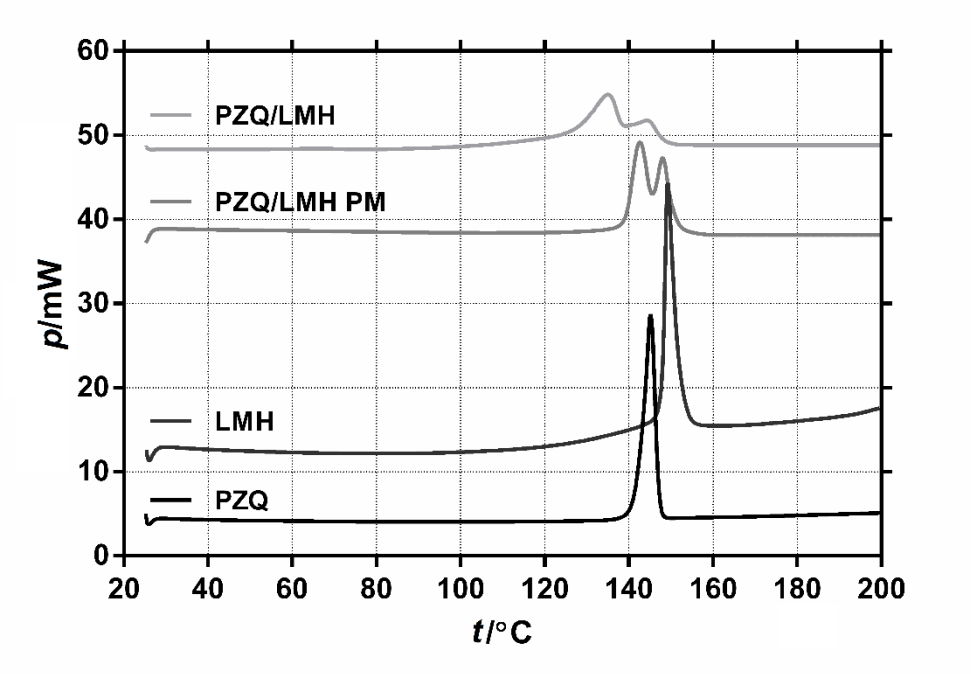
4.2. Polimerne disperzije

Polimerne disperzije pripremljene su mljevenjem uzoraka lijeka i polimera u masenom omjeru 1:1 te karakterizirane primjenom XRPD i DSC analize, uz određivanje topljivosti pripremljenih uzoraka u umjetnom želučanom, duodenalnom i crijevnom soku. Rezultati ovih ispitivanja prikazani su u tablici 6 te na slikama 15-24.

Mljevenje PZQ-a uz dodatak laktoze monohidrata (LMH) rezultiralo je produktom gdje su obje komponente djelomično zadržale svoju kristaliničnost (Slika 15). Količinu kristalne frakcije PZQ-a nije bilo moguće utvrditi primjenom termičke analize jer je endotermni pik taljenja lijeka u DSC termogramu PZQ/LMH mljevenog produkta (Slika 16) bio djelomično prekriven endotermnim pikom koji odgovara gubitku vode iz LMH pri temperaturi od 144 °C.[102] Usporedba DSC termograma fizičke smjese PZQ/LMH s onim odgovarajuće mljevene smjese, pokazuje da se procesom mljevenja djelomično smanjuje kristalnost PZQ-a u mljevenom uzorku, te dovodi do preraspodjele i uklanjanja molekula kristalizacijske vode iz LMH u uzorku. Međutim, topljivost mljevenog uzorka PZQ/LMH nije se značajno razlikovala u odnosu na onu čistog lijeka (Tablica 6, $p > 0,05$). Zbog toga taj tip uzorka nije dalje razvijan, niti je ispitivana promjena njegovih fizikalno-kemijskih svojstava tijekom čuvanja pri sobnoj temperaturi.



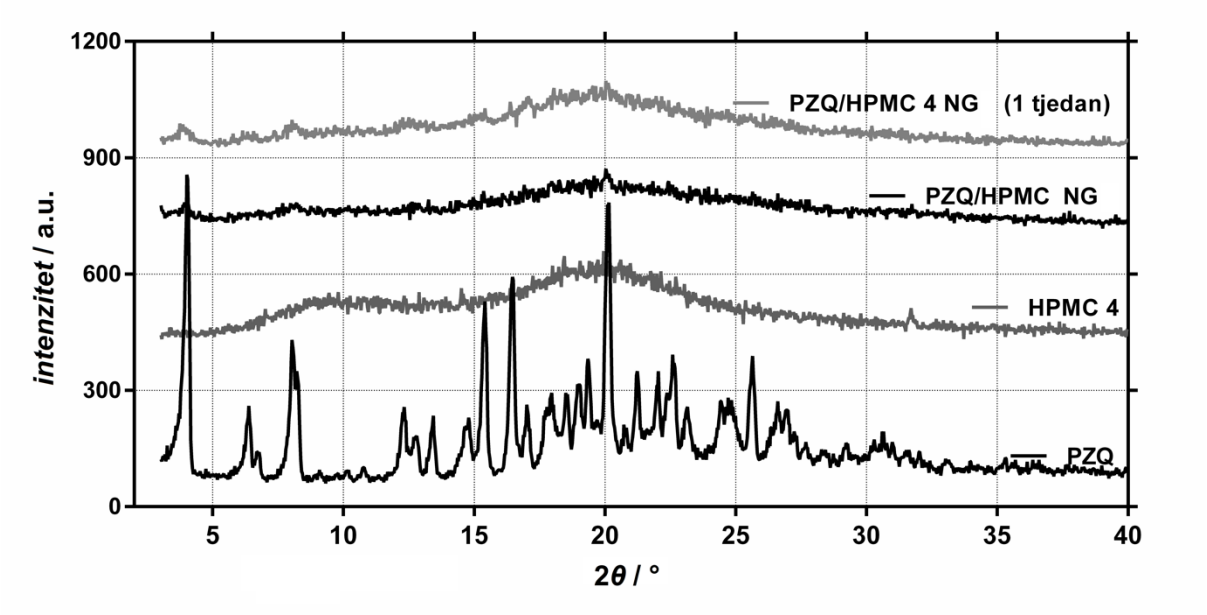
Slika 15. XRPD difraktogram uzorka PZQ-a, laktoze monohidrata (LMH) i odgovarajućeg produkta PZQ-a i laktoze pripremljenog suhim mljevenjem (NG).



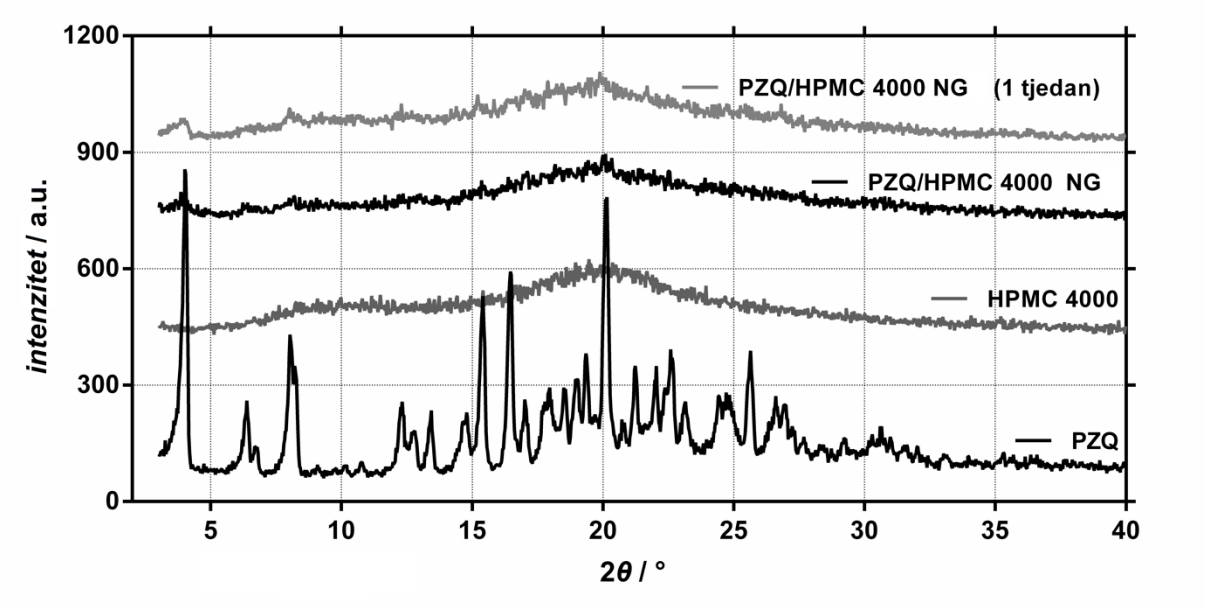
Slika 16. DSC termogram PZQ, laktoze (LMH), odgovarajuće fizičke smjese (PM) i mljevenog produkta u masenom omjeru 1:1.

Mljevenje PZQ-a s amorfnim polimerima (tj. hipromelozom, povidonom i kopovidonom) učinkovitije je u povećanju topljivosti lijeka u ispitivanom rasponu pH (Tablica 6), iako je porast topljivosti lijeka u tako pripremljenim uzorcima relativno slab. Iako rezultati XRPD analize ukazuju na amorfnost lijeka u navedenim uzorcima (Slike 17-20), rezultati DSC analize nisu u potpunosti u suglasju. Naime, u termogramima svih navedenih uzoraka, pik taljenja lijeka je prisutan, ukazujući samo na djelomično amorfiziranje lijeka u ispitivanim uzorcima (Slike 21-24). Naime, podaci o relativnoj kristaliničnosti lijeka u fizičkim smjesama PZQ i navedenih polimera, koje su pripremljene blagim miješanjem komponenata u tarioniku pistilom, odgovarale su teoretski očekivanim vrijednostima (podaci nisu prikazani). Također, FTIR analiza nije ukazala na značajniju interakciju PZQ i ispitivanih polimera u tim uzorcima (podaci nisu prikazani). Iz toga proizlazi da je opaženo nesuglasje u podacima dobivenim primjenom XRPD i DSC analize posljedica različite osjetljivosti pojedinih metoda za detekciju kristalne faze lijeka u uzorku,[103] koja također ovisi i o vrsti analiziranog uzorka.[52] Temeljem navedenog, opaženi porast topljivosti se u prvom redu može pripisati djelomičnoj amorfizaciji lijeka u navedenim uzorcima, kao i prisutnost hidrofilnog polimera koja olakšava močenje čestica lijeka otapalom, a to je prvi i često kritični korak u procesu otapanja lijeka.[104]

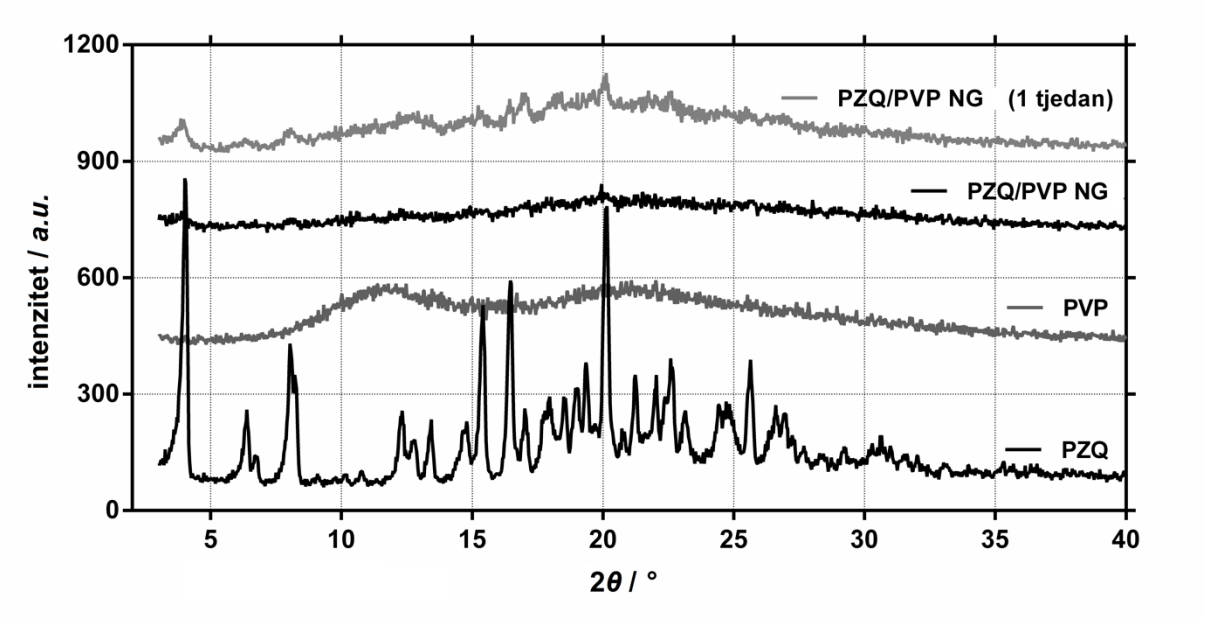
Pri tome, mljevenje PZQ-a sa HPMC rezultiralo je produktom sa izraženijim smanjenjem kristalnosti lijeka u usporedbi sa istim kod proizvoda pripremljenih sa PVP i CPVP (Tablica 6). Stupanj amorfizacije PZQ-a i topljivost dobivenih produkata nije ovisna o molekularnoj težini korištene HPMC. Iako mljeveni produkti PZQ-a, sa PVP i CPVP sadrže oko 40% viši stupanj kristalnosti frakcije PZQ-a u odnosu na produkte pripremljene s HPMC, njihova topljivost u vodi nije bitno drugačija (Tablica 6). Zapravo, temeljem rezultata prikazanih u tablici 6, nije moguće uspostaviti izravnu korelaciju između udjela amorfne frakcije lijeka u uzorku i njegove topljivosti, iako je logično za očekivati da takva međuovisnost postoji. Također, valja naglasiti da sve navedene polimerne disperzije pripremljene s tim hidrofilnim polimerima pokazuju fizičku nestabilnost, pri čemu dolazi do rekristalizacije ispitivanog perioda skladištenja. XRPD difraktogrami uzoraka koji su čuvani tjedan dana u dobro zatvorenom spremniku pri sobnoj temperaturi pokazuju izraženije pikove karakteristične za PZQ u odnosu na difraktograme istih uzoraka snimljenih neposredno nakon pripreme (Slike 17-20). Također, podaci dobiveni DSC analizom (Slike 21-24) pokazuju porast kristalne faze PZQ-a u uzorcima skladištenim u dobro zatvorenom spremniku pri sobnoj temperaturi, pri čemu porast relativne kristalinosti lijeka u uzorku varira u rasponu od 30 - 45% (podaci nisu prikazani). Opažena fizička nestabilnost tih polimernih disperzija može se pripisati nedostatku intramolekularnih interakcija između PZQ-a i testiranih polimera koji stabiliziraju sustav nastao mljevenjem, kao što su pokazale FTIR analize.[52,105] Osim toga, novija istraživanja potvrđuju da je za učinkovito uspostavljanje takvih interakcija nužna priprema disperzija PZQ iz otopine.[6]



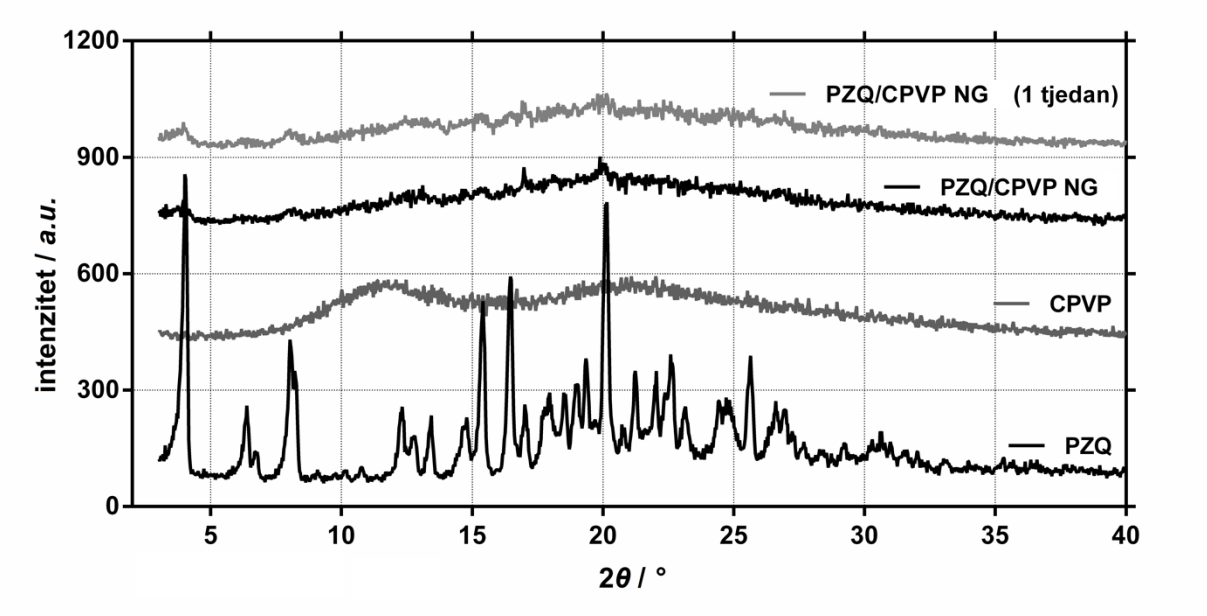
Slika 17. XRPD difraktogrami PZQ-a, hipromeloze sa niskim stupnjem viskoznosti (HPMC) i odgovarajućeg produkta PZQ-a i hipromeloze sa niskim stupnjem viskoznosti pripremljenog suhim mljevenjem (NG). Spektar mljevenog produkta snimljen je odmah nakon pripreme, te nakon tjedan dana čuvanja na sobnoj temperaturi.



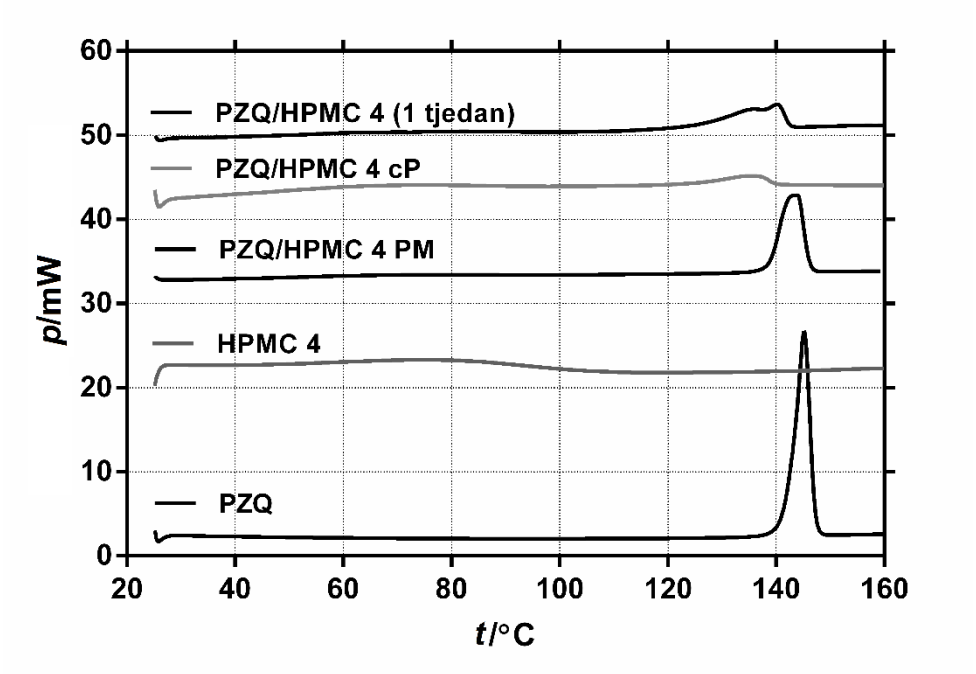
Slika 18. XRPD difraktogrami PZQ-a, hipromeloze sa visokim stupnjem viskoznosti (HPMC 4000) i odgovarajućeg produkta PZQ-a i hipromeloze sa visokim stupnjem viskoznosti pripremljenog suhim mljevenjem (NG). Spektar mljevenog produkta snimljen je odmah nakon pripreme, te nakon tjedan dana čuvanja na sobnoj temperaturi.



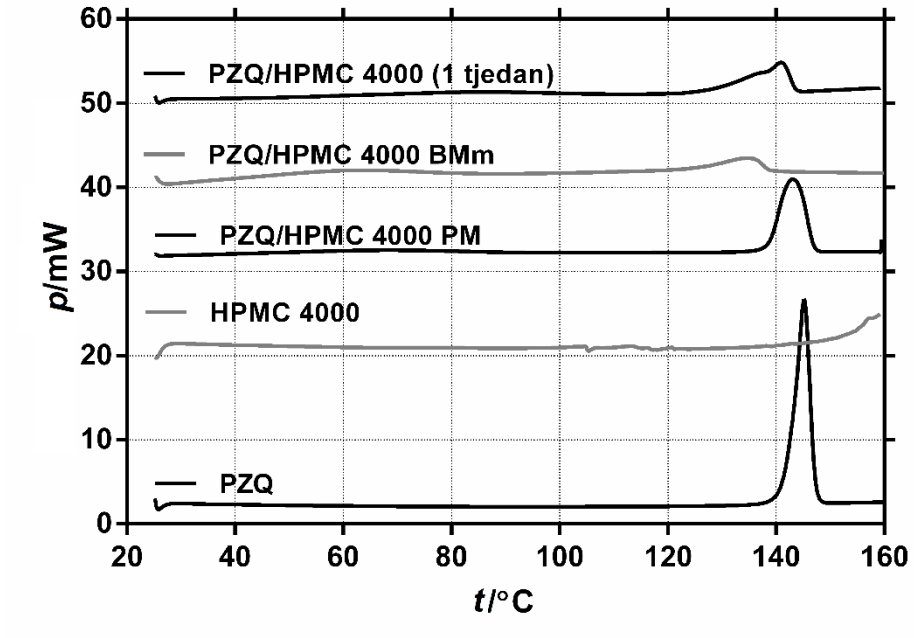
Slika 19. XRPD difraktogrami PZQ-a, povidona i odgovarajućeg produkta PZQ-a i povidona (PVP) pripremljenog suhim mljevenjem (NG). Spektar mljevenog produkta snimljen je odmah nakon pripreme te nakon tjedan dana čuvanja na sobnoj temperaturi.



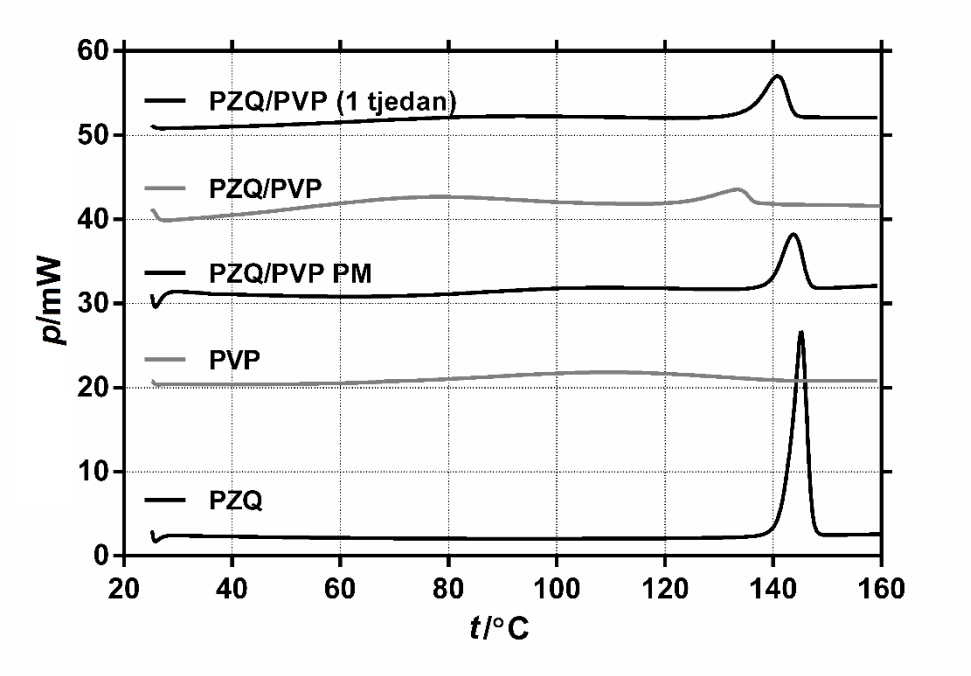
Slika 20. XRPD difraktogrami PZQ-a, kopovidona (CPVP) i odgovarajućeg produkta PZQ-a i kopovidona pripremljenog suhim mljevenjem (NG). Spektar mljevenog produkta snimljen je odmah nakon pripreme, te nakon tjedan dana čuvanja na sobnoj temperaturi.



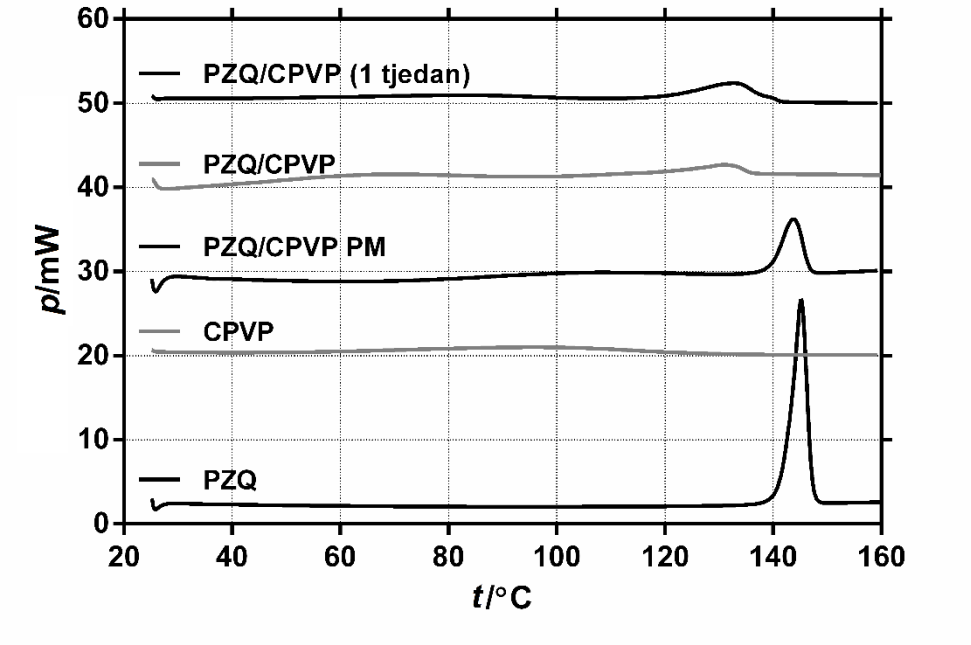
Slika 21. DSC termogrami PZQ, hipromeloze s niskim stupnjem viskoznosti (HPMC 4), hidrofilnog polimera odgovarajuće fizičke smjese (PM) i mljevenog produkta u masenom omjeru 1:1 odmah nakon pripreme te nakon tjedan dana čuvanja na sobnoj temperaturi.



Slika 22. DSC termogrami PZQ, hipromeloze s visokim stupnjem viskoznosti (HPMC 4000), hidrofilnog polimera odgovarajuće fizičke smjese (PM) i mljevenog produkta u masenom omjeru 1:1 odmah nakon pripreme te nakon tjedan dana čuvanja na sobnoj temperaturi.



Slika 23. DSC termogrami PZQ, povidone (PVP), hidrofilnog polimera odgovarajuće fizičke smjese (PM) i mljevenog produkta u masenom omjeru 1:1 odmah nakon pripreme te nakon tjedan dana čuvanja na sobnoj temperaturi.

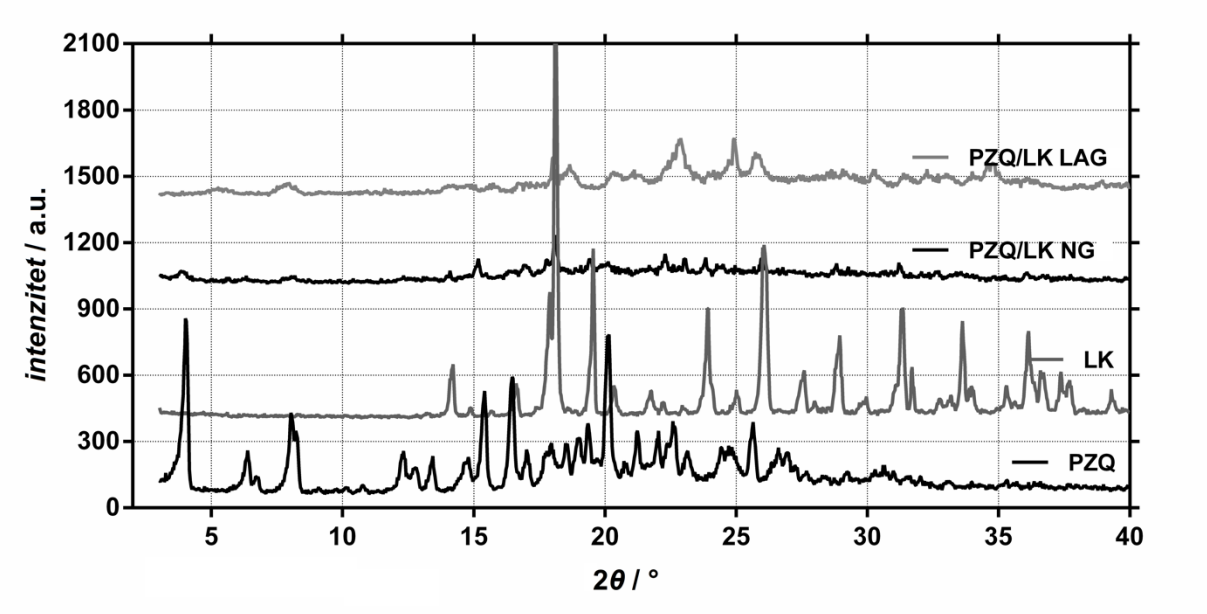


Slika 24. DSC termogrami PZQ, kopovidona (CPCP), hidrofilnog polimera odgovarajuće fizičke smjese (PM) i mljevenog produkta u masenom omjeru 1:1 odmah nakon pripreme te nakon tjedan dana čuvanja na sobnoj temperaturi.

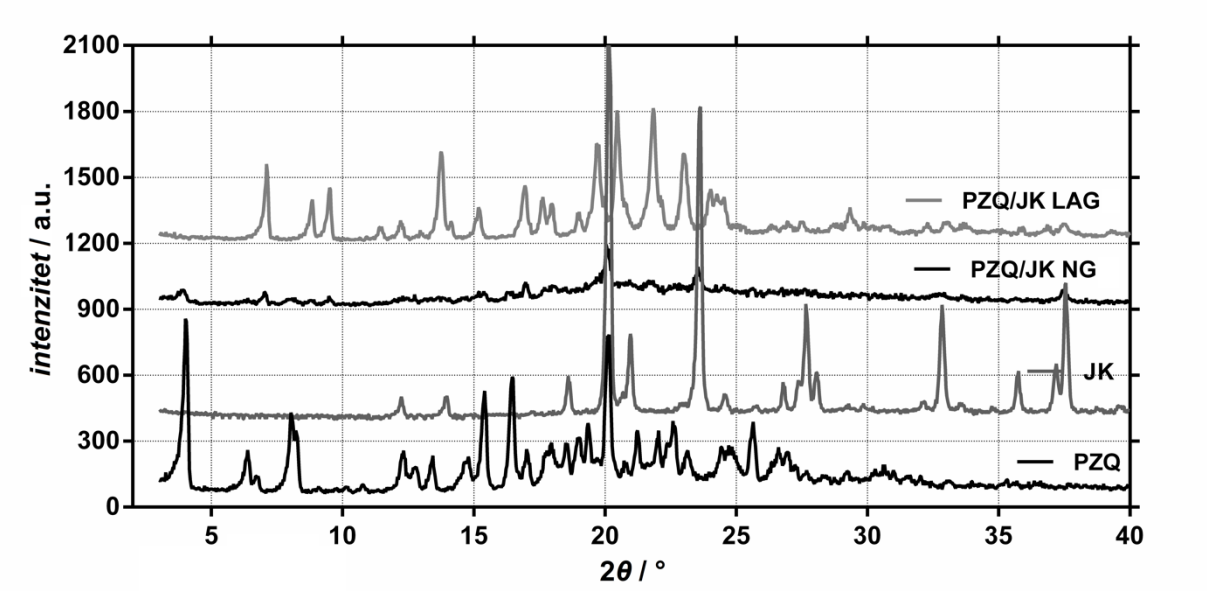
4.3. Kokristali

Za sintezu kokristala PZQ-a sa odabranim organskim kiselinama, primijenjene su dvije različite tehnike pripreme. Prva je bila suho mljevenje (NG) spojeva u ekvimolarnom omjeru, a druga mljevenje uz dodatak otapala (LAG) gdje su dodane male (katalitičke) količine otapala u ekvimolarnu smjesu lijek/organska kiselina kako bi se olakšalo nastajanje kokristala. XRPD analiza dobivenih produkata (Slike 25, 26, 27 i 28) pokazala je da je NG rezultiralo produktom smanjenje kristalnosti u kojemu su još uvijek prisutni pikovi karakteristični za polazne spojeve. LAG se pokazala učinkovitijom metodom za pripremu PZQ kokristala s odabranim organskim kiselinama. Mljevenjem PZQ s ekvimolarnom količinom limunske kiseline rezultiralo je pastoznim produktom. Čini se da je dodatak male količine etanola uzrokovao oslobađanje molekula kristalizacijske vode iz monohidrata limunske kiseline tijekom postupka mljevenja, što je rezultiralo ovlaživanjem produkta. U svim drugim slučajevima, produkti dobiveni NG i LAG su kristalni prašci dobre sipkosti. U XRPD analiza PZQ/LK produkta pripremljenog LAG, ukazala je na prisutnost nekoliko novih pikova, na vrijednostima kuta difrakcije od 18,51°; 22,74° i 25,65°, što upućuje na nastanak novog kokristala (Slika 25). U DSC termogramu smjese PZQ/LK pripremljene LAG, može se zapaziti novi endotermni pik pri temperaturi od 51,07 °C (ΔH = 172813 J/g) (Slika 29) što također potvrđuje nastajanje nove krute faze. Takav pik nije bio prisutan u termogramu PZQ/LK uzorka pripremljenom NG, koji u navedenom području temperatura ne pokazuje značajnije termičke promjene. U oba termograma, pikovi koji odgovaraju taljenju polaznih komponenata, koji su jasno vidljivi u odgovarajućim fizičkim smjesama, nisu prisutni (Slika 29).

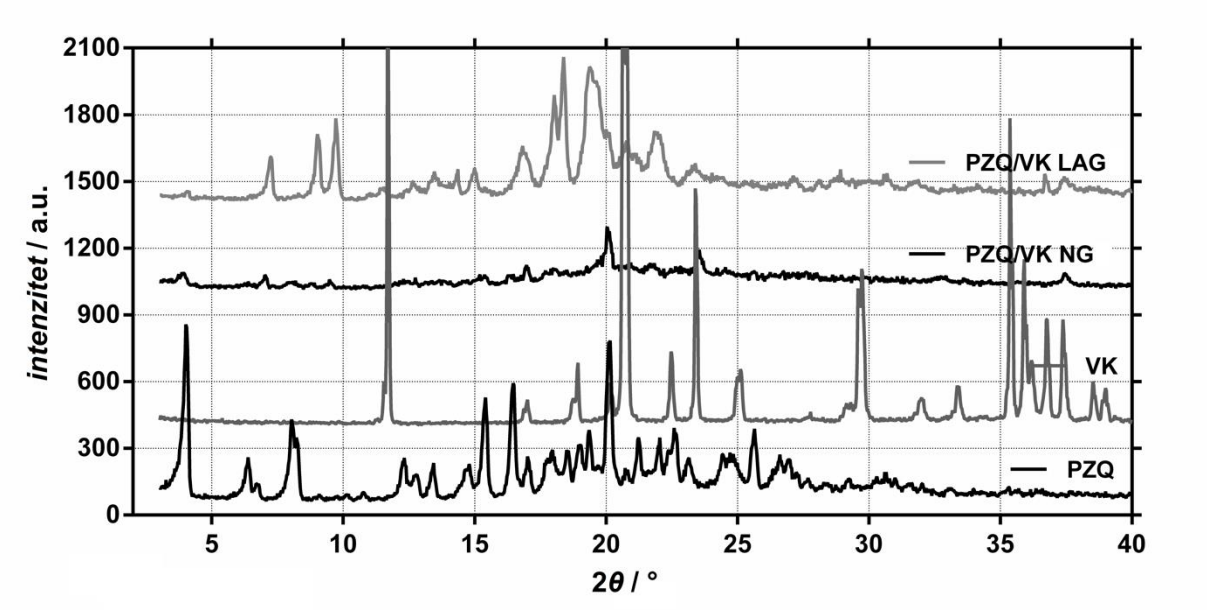
XRPD difraktogram PZQ/JK uzorka koji je pripremljen LAG pokazuje nekoliko novih pikova pri kutovima difrakcije od 7,11°; 8,82°; 9,48°; 13,74°; 19,68°; 20,46° i 22,98°. Za PZQ/VK i PZQ/SK uzorke pripremljene istim postupkom, novi pikovi su zabilježeni na slijedećim vrijednostima kuta difrakcije 7,20; 8,82; 9,48; 13,74; 19,68; 20,46; 21,81; 22,98 i 7,20; 8,99; 9,72; 18,39; 19,32; 21,81 (Slike 27 i 28). Nadalje, usporedbom XRPD uzoraka PZQ-a, odgovarajućih organskih kiselina i pripremljenih produkata proizlazi da produkti nastali LAG ne sadrže pikove preostalih početnih komponenata, što upućuje na nastanak kokristala PZQ i navedenih organksih kiselina u stehiometrijskom odnosu 1:1.[93]



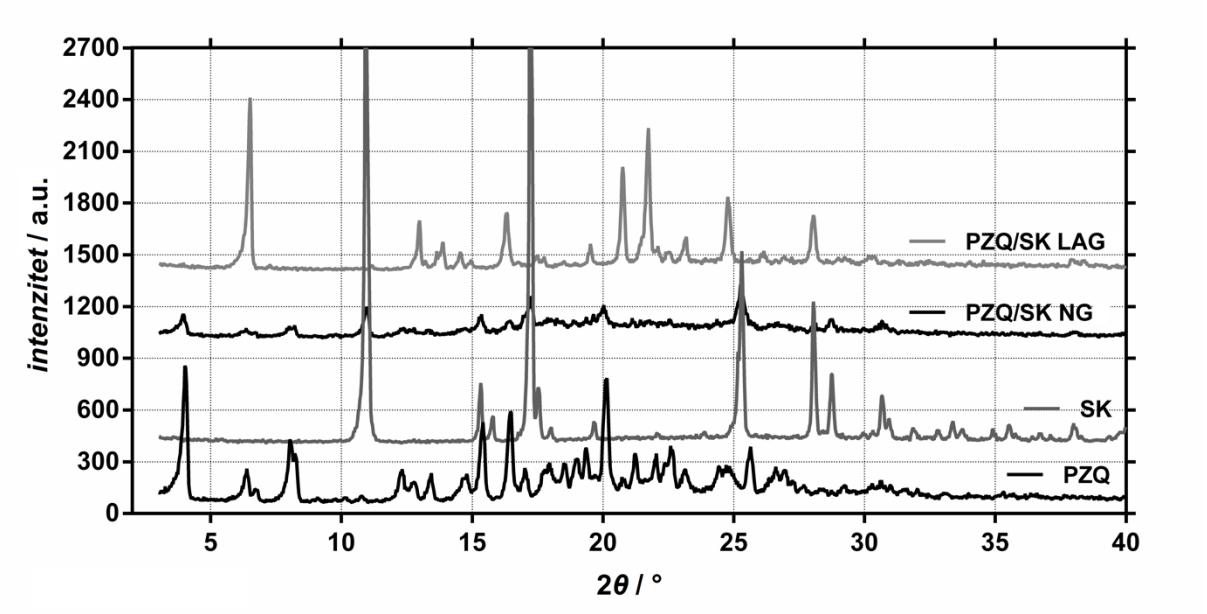
Slika 25. XRPD uzorak PZQ-a, limunske kiseline (LK) i ekvimolarnog mljevenog produkta PZQ-a s limunskom kiselinom, oboje pripremljenih suhim mljevenjem (NG) i mljevenjem s dodatkom otapala (LAG).



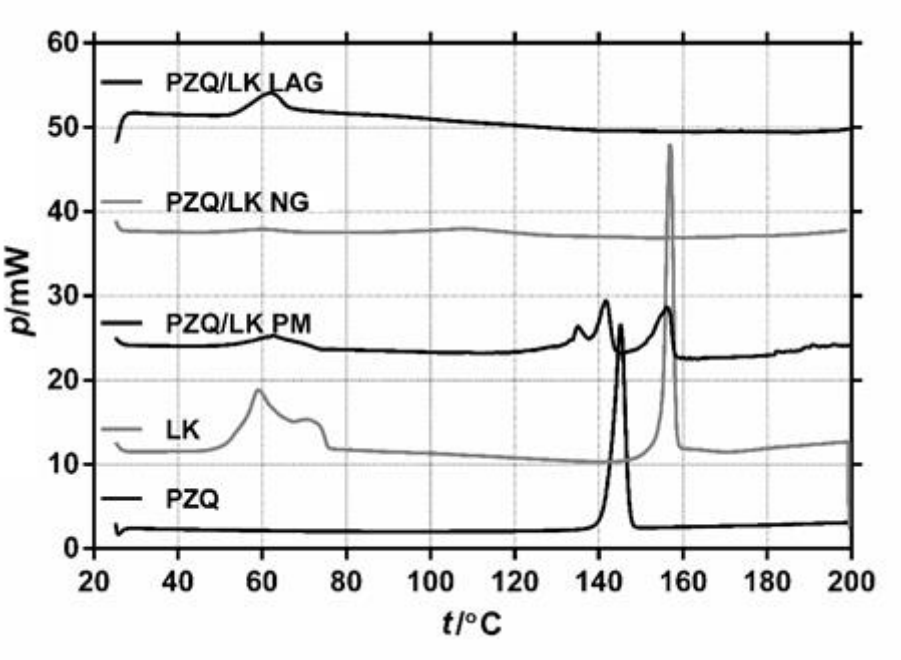
Slika 26. XRPD uzorak PZQ-a, jabučne kiseline (JK) i ekvimolarnog mljevenog produkta PZQ-a s jabučnom kiselinom, oboje pripremljenih suhim mljevenjem (NG) i mljevenjem s dodatkom otapala (LAG).



Slika 27. XRPD uzorak PZQ-a, vinske kiseline (VK) i ekvimolarnog mljevenog produkta PZQ-a s vinskom kiselinom, oboje pripremljenih suhim mljevenjem (NG) i mljevenjem s dodatkom otapala (LAG).

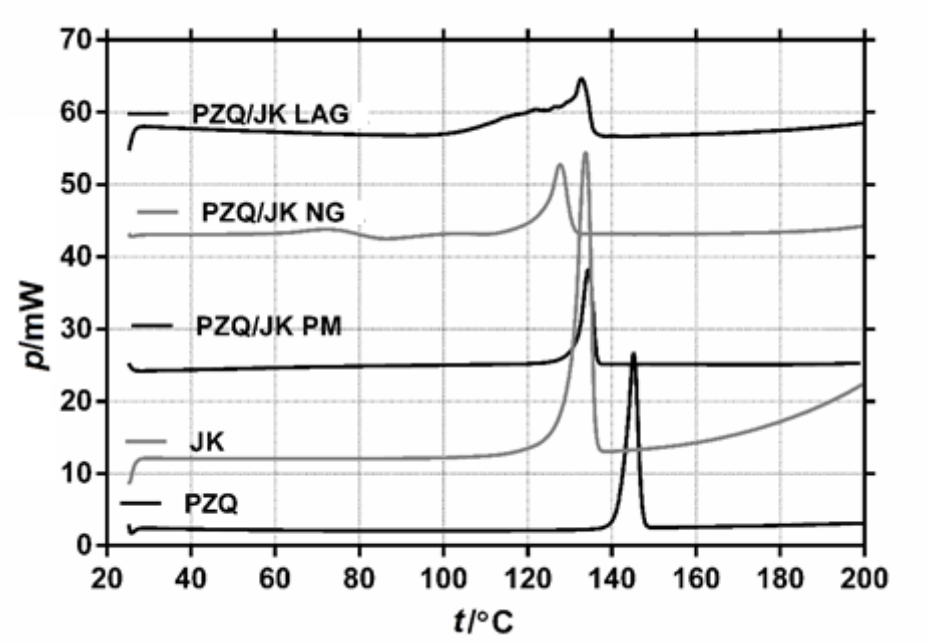


Slika 28. XRPD uzorak PZQ-a, salicilne kiseline (SK) i ekvimolarnog mljevenog produkta PZQ-a sa salicilnom kiselinom, oboje pripremljenih suhim mljevenjem (NG) i mljevenjem s dodatkom otapala (LAG).

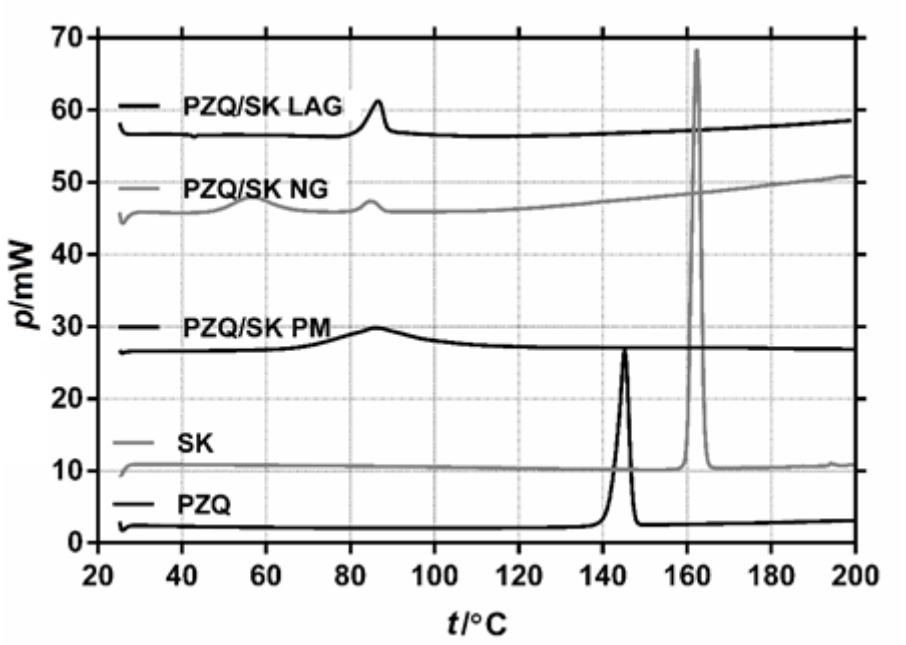


Slika 29. DSC termogram PZQ, limunske kiseline (LK), odgovarajuće fizičke smjese (PM) i mljevenog produkta u ekvimolarnom omjeru pripremljenog suhim mljevenjem (NG) i mljevenjem s dodatkom otapala (LAG).

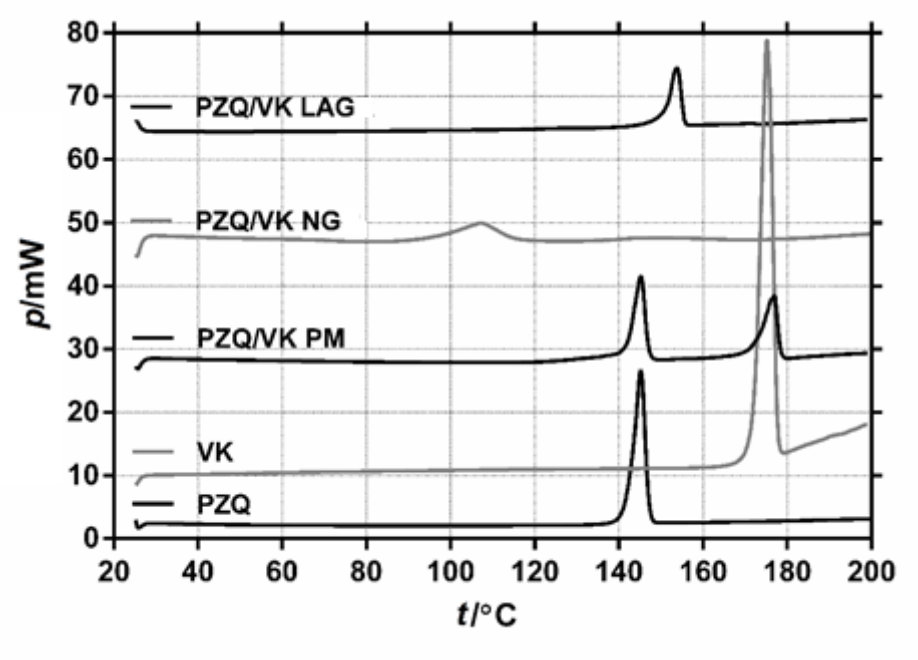
Rezultati DSC analize također potvrđuju nastanak nove čvrste faze kod produkta PZQ/VK koji je pripremljen metodom LAG. U termogramu uzorka (Slika 32) vidljiv je novi egzotermni pik pri temperaturi od 150,81 °C, uz entalpiju taljenja od 80,98 J/g, te su termička svojstva nastalog produkta značajno različita od onih polaznih materijala. U DSC termogramu PZQ/VK uzorka koji je pripremljen NG prisutan je egzotermni pik pri 105,75 °C, koji se može pripisati termički induciranoj interakciji među komponentama, koja je djelomično potencirana suhim mljevenjem. Rezultati DSC analize nisu bili od značajne koristi u karakterizaciji uzoraka PZQ/JK i PZQ/SK, zbog prisustva termički inducirane interakcije. Naime, u termogramima fizičkih smjesa navedenih uzoraka (slike 30 i 31), pikovi koji odgovaraju taljenju pojedinih komponenata nisu prisutni, što je tipično za uzorke u kojima dolazi do termički inducirane interakcije tijekom DSC analize.[106]



Slika 30. DSC termogram PZQ, jabučne kiseline (JK), odgovarajuće fizičke smjese (PM) i mljevenog produkta u ekvimolarnom omjeru pripremljenog suhim mljevenjem (NG) i mljevenjem s dodatkom otapala (LAG).

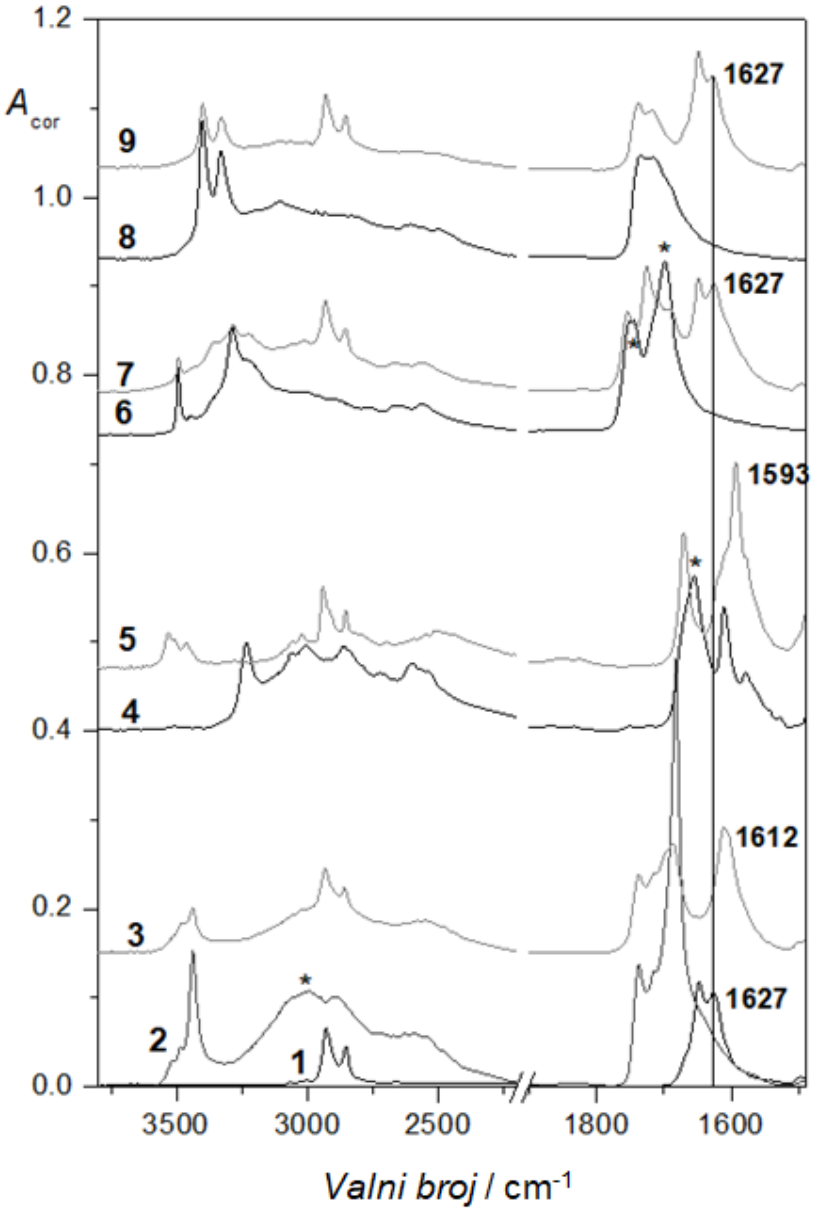


Slika 31. DSC termogram PZQ, salicilne kiseline (SK), odgovarajuće fizičke smjese (PM) i mljevenog produkta u ekvimolarnom omjeru pripremljenog suhim mljevenjem (NG) i mljevenjem s dodatkom otapala (LAG).



Slika 32. DSC termogram PZQ, vinske kiseline (VK), odgovarajuće fizičke smjese (PM) i mljevenog produkta u ekvimolarnom omjeru pripremljenog suhim mljevenjem (NG) i mljevenjem s dodatkom otapala (LAG).

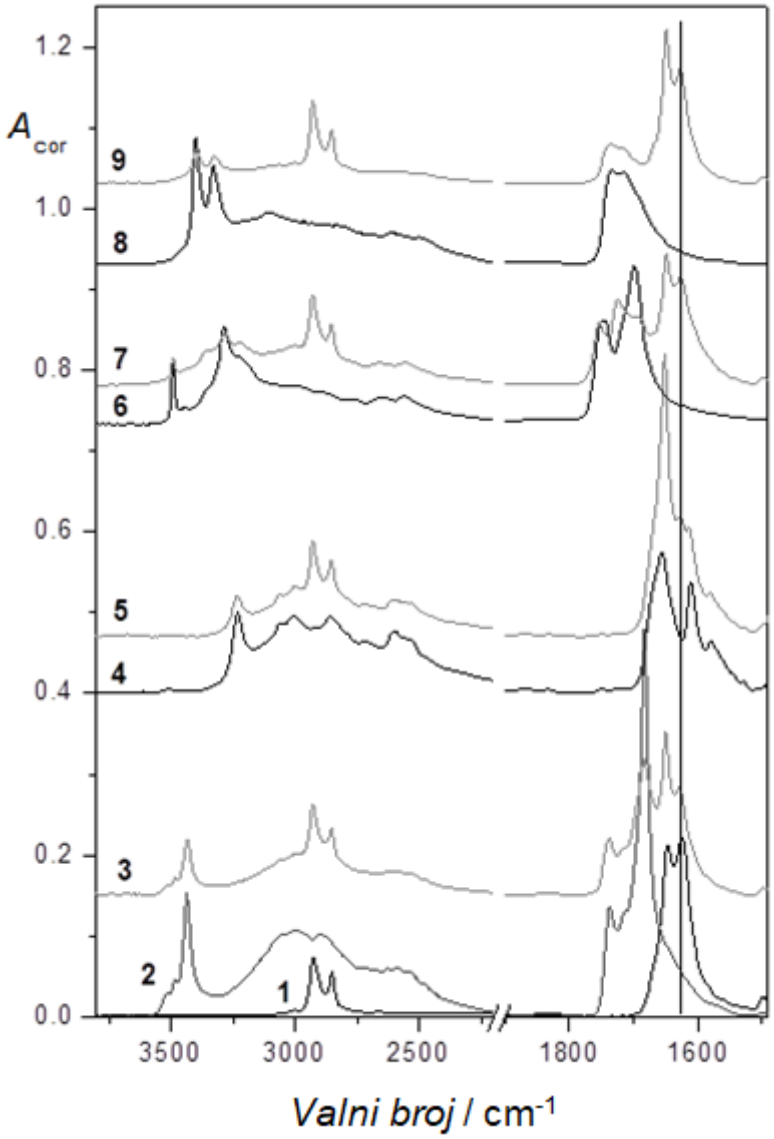
Daljnje informacije o kemijskim interakcijama između PZQ i ispitanih organskih kiselina te o nastanku odgovarajućih kokristala dobivene su primjenom vibracijske spektroskopije (Slika 33).



Slika 33. Segment FTIR-ATR spektara netretiranog lijeka, organskih kiselina i odgovarajućih binarnih produkata pripremljenih mljevenjem uz dodatak otapala u rasponu valnih brojeva od 4000 do 1500 cm^{-1}: PZQ (1), JK (2), PZQ/JK (3), SK (4), PZQ/SK (5), LK (6), PZQ/LK (7), VK (8), PZQ/VK (9).

Amidna I vrpca, koja se pripisuje vibracijama istezanja dvije C=O veze amidnog karbonila u strukturi PZQ zabilježena je pri 1649 i 1628 cm^{-1}.[93] Pri tome, drugi od navedenih signala može se pripisati vibracijama istezanja rigidnijeg amidnog karbonila u piperazinskom prstenu. Uvidom u ATR spektre prikazane na slici 33, vidljivo je da su navedeni signali pomaknuti prema manjim valnim brojevima (spektri 3 i 5), tj. na 1612 odnosno 1593 cm^{-1}, što upućuje na nastajanje nove čvrste faze u produktima s jabučnom i salicilnom kiselinom pripremljenim postupkom vlažnog mljevenja. Stvaranje vodikovih veza između PZQ-a i navedenih koformera u tim kokristralima rezultiralo je smanjenjem energije potrebne za istezanja C=O veza. S obzirom na istovjetan pomak obje apsorpcijske vrpce koje se u spektrima odgovarajućih kokristala pojavljuju kao jedna široka vrpca, može se pretpostaviti da su obje karbonilne skupine molekule PZQ uključene u nastajanje vodikovih veza s jabučnom i salicilnom kiselinom (Slika 33). Osim toga, pomak apsorpcijske vrpce koja odgovara vibracijama C=O istezanja u molekuli salicilne kiseline sa 1653 na 1670 cm^{-1}, (spektri 4 i 5), dodatno potvrđuje nastajanje novih vodikovih veza i ugradnju salicilne kiseline u kokristal.[93] U ATR spektru jabučne kiseline izražena apsorpcijska vrpca pri 3438 cm^{-1} pripisuje se vibracijama istezanja OH veze u CHOH skupini, a široki signal pri 3000 cm^{-1} pripisan je frekvencijama istezanja OH skupine u COOH skupini vezanoj intramolekulskim vodikovim vezama, dok široki signal u području od 2600 do 2500 cm^{-1} odgovara vodikovim vezama u dimeru. Tri signala pri 1737, 1714 i 1683 cm^{-1} pripisani su frekvencijama vibracija C=O skupine u COOH skupini vezanoj u dimer.[107] Usporedbom IR spektara čiste jabučne kiseline i produkta s PZQ-om (Slika 33, spektri 2 i 3) uočena je značajna razlika u intenzitetu signala pri 3438 cm^{-1} i 1683 cm^{-1}, karakterističnih za -OH i C=O skupine, što ukazuje na zaključak da hidroksilna grupa iz CHOH skupine u strukturi jabučne kiseline najvjerojatnije dominantno sudjeluje u stvaranju vodikove veze s karbonilnom skupinom PZQ. Iako značajniji pomaci karakterističnih apsorpcijskih vrpca PZQ u spektru 7 nisu uočeni, pomak signala C=O skupine u strukturi molekule limunske kiseline[108] od 1751, 1745 i 1699 cm^{-1} na 1753, 1726 i 1691 cm^{-1} također može se pripisati nastanku nove čvrste faze u uzorku pripremljenom vlažnim mljevenjem lijeka i limunske kiseline. U IR spektru produkta pripremljenom vlažnim mljevenjem PZQ i vinske kiseline nisu zabilježeni značajniji pomaci karakterističnih apsorpcijskih vrpca (Slika 33). Apsorpcijske vrpce pri 3402 i 3330 cm^{-1} u spektrima 8 i 9 pripisane su frekvencijama istezanja OH veze hidroksilne skupine u strukturi vinske kiseline, dok vrpca pri 3100 cm^{-1} odgovara frekvencijama istezanja OH veze u

karboksilnoj skupini molekule. Signali tipični za vibracije istezanja C=O veze u karbonilnoj skupini zabilježeni su na 1733 i 1716 cm^{-1}.[109] Potrebno je istaknuti da primjenom infracrvene spektroskopije, nastajanje nove čvrste faze nije dokazano u uzorcima koji su pripremljeni pažljivim miješanjem komponenata u ahatnom tarioniku pistilom, kao ni u uzorcima pripremljenim postupkom suhog mljevenja. Spektri uzoraka pripremljeni na taj način odgovaraju zbroju spektara pojedinih komponenata (Slika 34).

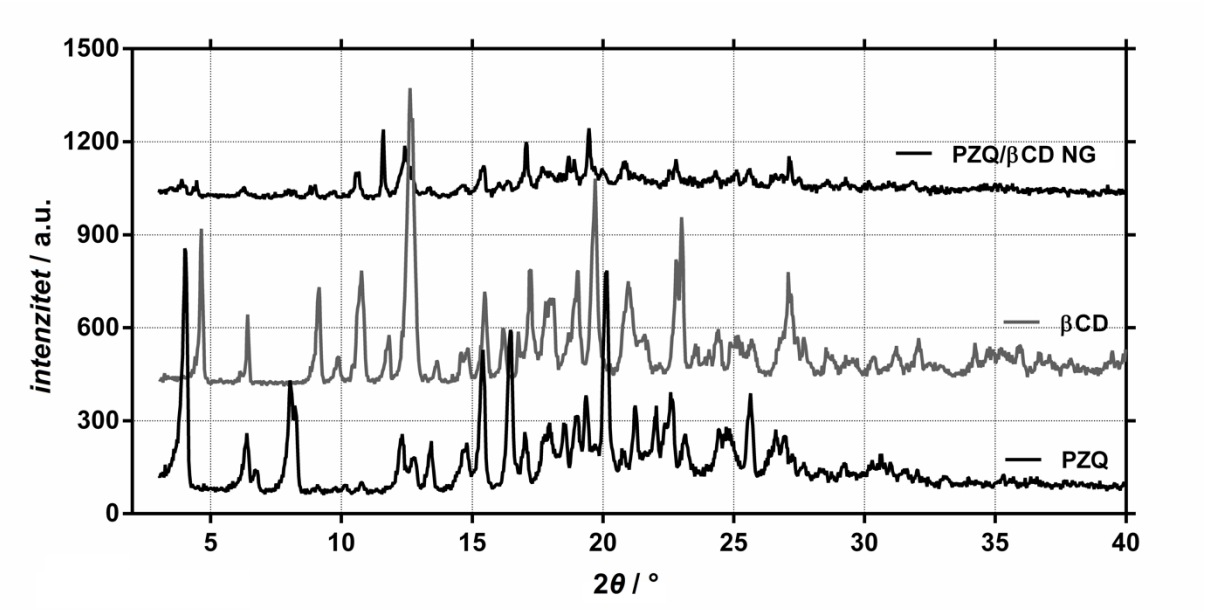


Slika 34. Korigirani ATR spektri PZQ i njegovih smjesa s ispitivanim kiselinama pripremljeni miješanjem u agatnom tarioniku pistilom. Uzorci pripremljeni suhim mljevenjem pokazuju istovjetne spektre (podaci nisu prikazani). 1=PZQ; 2=JK; 3=PZQ/JK; 4=SK; 5= PZQ/SK; 6=LK; 7=PZQ/LK; 8=VK; 9=PZQ/VK.

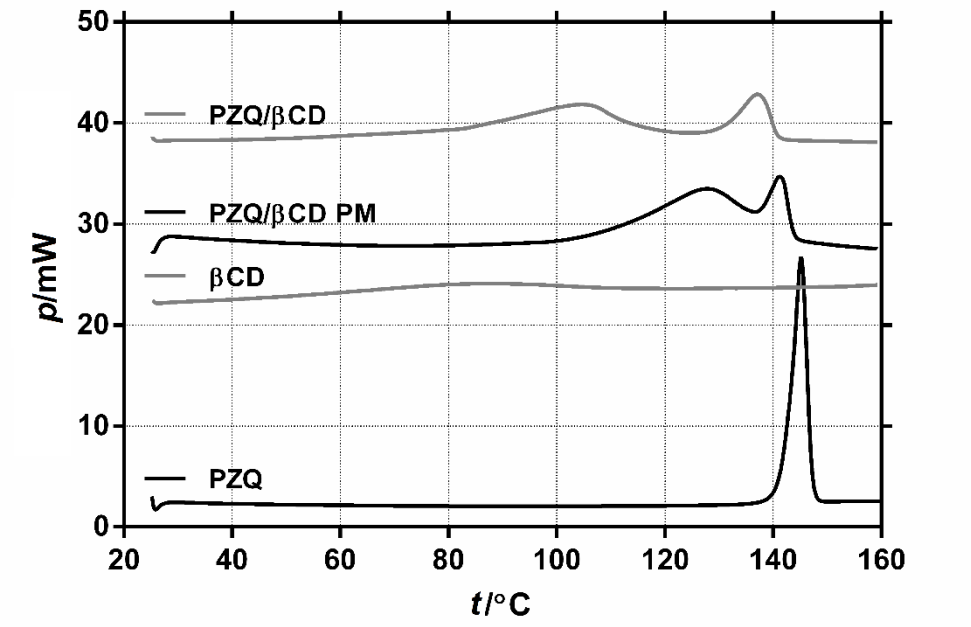
Kokristali pripremljeni vlažnim mljevenjem pokazuju o pH-vrijednosti ovisnu topljivost (Tablica 6), a najveća topljivost zabilježena je u umjetnom duodenalnom mediju s pH vrijednosti 4,5. Organske kiseline koje su korištene u pripremi kokristala u svojoj strukturi sadrže nekoliko skupina koje mogu ionizirati. Odgovarajuće p*K*a vrijednosti za limunsku kiselinu iznose 3,13; 4,76 i 6,40, za jabučnu kiselinu 3,40 i 5,13, za vinsku kiselinu 2,98 i 4,34[110], dok su za salicilnu kiselinu p*K*a vrijednosti 2,97 i 13,74.[111] Pri pH 1,2, navedene organske kiseline su u potpunosti neionizirane, te je pri tim uvjetima topljivost kokristala najniža (Tablica 6). Povećanje pH vrijednosti na 4,5 dovodi do ionizacije karboksilne skupine u molekuli organske kiseline, čime se pridonosi topljivosti produkta te pri toj pH-vrijednosti uzorci pokazuju najizraženiju topljivost. Daljnja ionizacija organskih molekula uzrokovana porastom pH-vrijednosti medija na 6,8 nepovoljno utječe na topljivost ispitivanih produkta, što se vrlo vjerojatno može pripisati smanjenjem interakcija između potpuno ioniziranih molekula organskih kiselina i lijeka. Od analiziranih sustava, najveće povećanje topljivosti, a time i najveći potencijal za daljnji razvoj novog lijeka pokazao je kokristal s jabučnom kiselinom, dok su ostali uzorci isključeni iz daljnjih ispitivanja.

4.4. Inkluzijski kompleksi s ciklodekstrinima

Inkluzijski kompleksi ciklodekstrina s PZQ-a pripremljeni su postupkom suhog mljevenja pri sobnoj temperaturi uz stehiometrijski omjer lijeka i ispitivanih ciklodekstrina 1:1. XRPD analiza pokazala je da se učinkovitost interakcije lijeka s ispitivanim ciklodekstrinima može dovesti u izravnu vezu sa stupnjem kristalnosti korištenog ciklodekstrinskog derivata. Pri tome, β-ciklodekstrin kao kristalna tvar bio je najmanje učinkovit u stvaranju inkluzijskih kompleksa, rezultirajući produktima koji sadrže visoki udio neizreagiranih polaznih komponenti. Naime, u XRPD spektru navedenog produkta (Slika 35), prisutni su brojni pikovi tipični za polazne komponente. DSC analiza istog uzorka potvrdila je visoki udio kristalnog lijeka u pripremljenom produktu lijeka (Tablica 6, Slika 36). Navedeni rezultati jasno pokazuju da postupak suhog mljevenja nije bio dostatno učinkovit kako bi potaknuo odgovarajuće interakcije u tretiranom uzorku i doveo do nastajanja inkluzijskog kompleksa. To se vjerojatno može pripisati velikoj stabilnosti kristala β-ciklodekstrina.[112] Vlažno mljevenje nije bilo učinkovitije u uspostavljanju interakcija u čvrstom stanju između PZQ i βCD, rezultirajući produktom kojeg je bilo izrazito teško sakupiti iz vrčeva za mljevenje (podaci nisu prikazani). Temeljem svega navedenog, produkt pripremljen suhim mljevenjem PZQ i βCD pokazao je ograničenu topljivost (Tablica 6), koja je bila otprilike oko 88 % veća od one čistog lijeka.



Slika 35. XRPD difraktogram PZQ-a, β-ciklodekstrina (βCD) i njihovog produkta pripremljenog suhim mljevenjem u ekvimolarnom omjeru (NG).

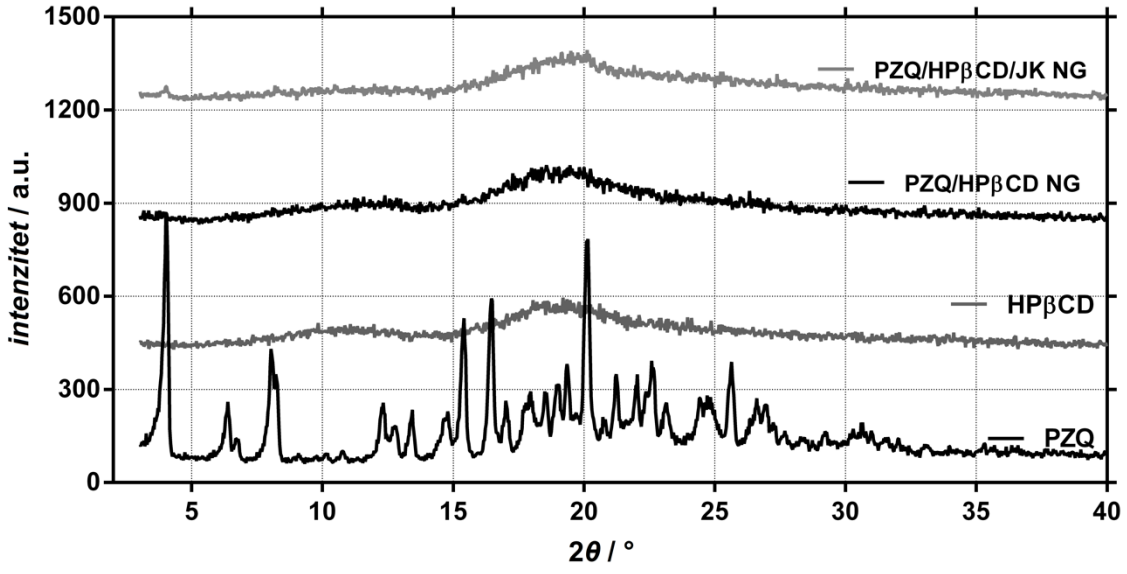


Slika 36. DSC termogram PZQ, β-ciklodekstrina (βCD), odgovarajuće fizičke smjese (PM) i mljevenog produkta u ekvimolarnom omjeru pripremljenog suhim mljevenjem (NG).

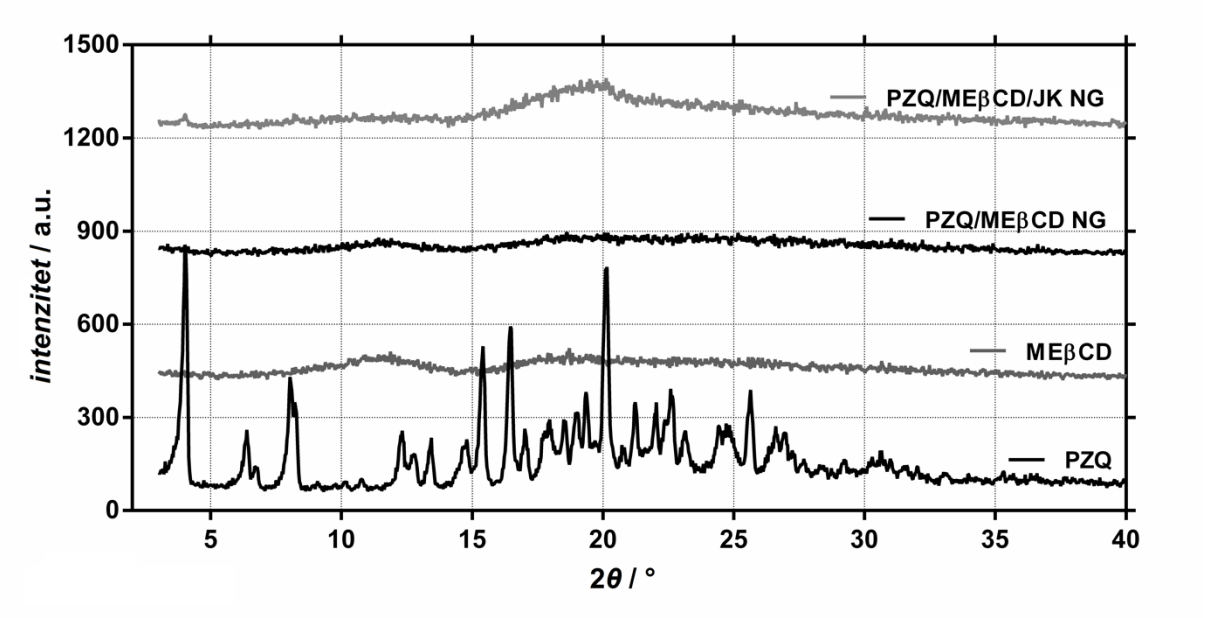
Mljevenje PZQ s amorfnim derivatima ispitivanih CD (HPβCD, MEβCD i SBEβCD) rezultiralo je amorfnim produktima, što je nedvojbeno dokazano rezultatima XRPD i DSC analize tih uzoraka (Slike 37-42). Navedeni rezultat je u skladu s rezultatima ranijih istraživanja koji nedvojbeno potvrđuju izraženiji afinitet amorfnih derivata βCD prema uspostavljanju interakcija s lijekom u čvrstom stanju i nastajanju inkluzijskih kompleksa tijekom procesa suhog mljevenja.[113,114] Osim toga, amorfni derivati β-ciklodekstrina sadrže do 5% apsorbirane vlage, čije bi oslobođenje tijekom mehanokemijske reakcije moglo pridonijeti interakcijama između tretiranih spojeva. Nadalje, upotreba ciklodekstrina kao aditiva u postupku mljevenja bio je najučinkovitiji pristup u povećanju topljivosti PZQ-a. U usporedbi s topljivosti čistog lijeka, porast topljivosti kompleksa pripremljenih tehnikom suhog mljevenja varirala je u rasponu od 110% (PZQ / SBEβCD) do 137% (PZQ / MEβCD) (Tablica 6). Iako XRPD i DSC analiza ne pruža nedvojbeni dokaz da su pripremljeni amorfni produkti uistinu pravi inkluzijski kompleksi[114], rezultati prethodnih NMR istraživanja pokazuju da otapanjem takvih amorfnih produkata u vodi nastaje otopina inkluzijskih kompleksa, te da je nastanak inkluzijskih kompleksa jedan od, ako ne i ključni mehanizam

kojim se može objasniti opaženo povećanje topljivosti lijeka u mljevenim uzorcima s ciklodekstrinima.[113]

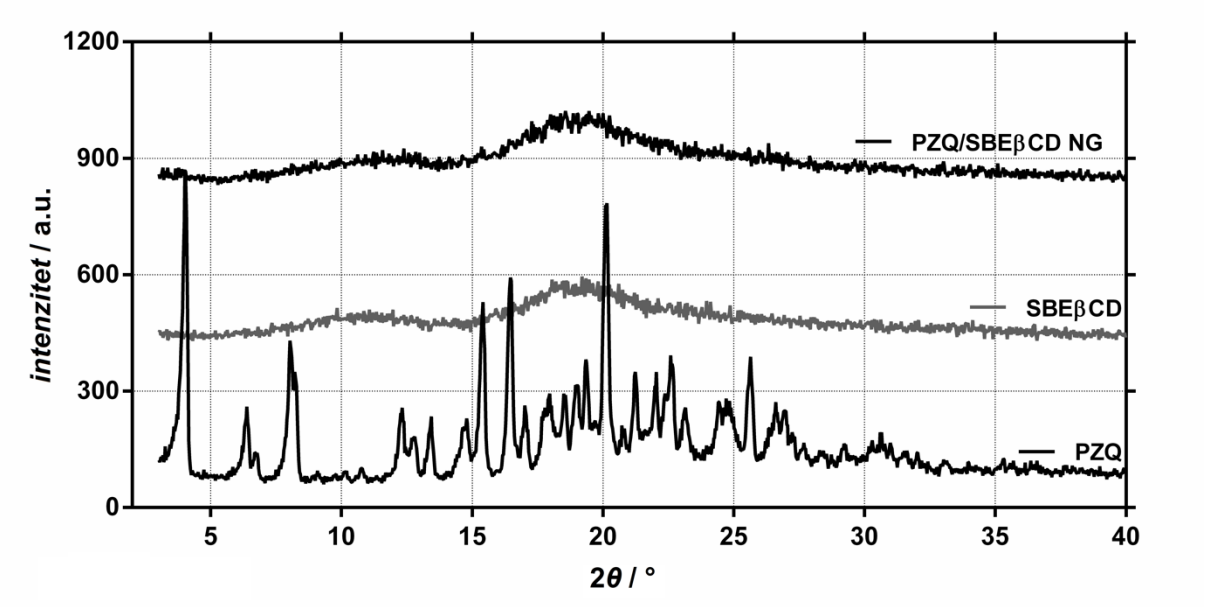
Kako bi se iskoristio povoljan utjecaj JK na topljivost PZQ-a te ispitao potencijalni sinergijski učinak između JK i HPβCD ili MEβCD na povećanje topljivosti lijeka, pripremljeni su i ternarni kompleksi između lijeka, organske kiseline i navedenih amorfnih derivata βCD, suhim mljevenjem navedenih komponenata u molarnom omjeru 1:1:1. Primjenom XRPD i DSC analizom (Slike 37, 38, 39, 40, 41 i 42) potvrđeno je da su pripremljeni produkti u potpunosti amorfni, s obzirom da u XRPD spektrima nisu uočeni pikovi karakteristični za polazne supstancije, a odgovarajući DSC termogrami ne pokazuju pikove taljenja polaznih komponenata. Međutim, topljivost tako pripremljenih ternarnih kompleksa bila je znatno niža nego kod odgovarajućih kokristala ili binarnih inkluzijskih spojeva (Tablica 6). Stoga su provedene *in vitro* studije oslobađanja, kako bi se u potpunosti procijenio potencijal primjene navedenih uzoraka u razvoju novih i učinkovitijih formulacija PZQ te isključili problemi vezani uz pojavu supersaturacije, koja često ograničava primjenjivost binarnih i ternarnih ciklodekstrinskih kompleksa.[115,116]



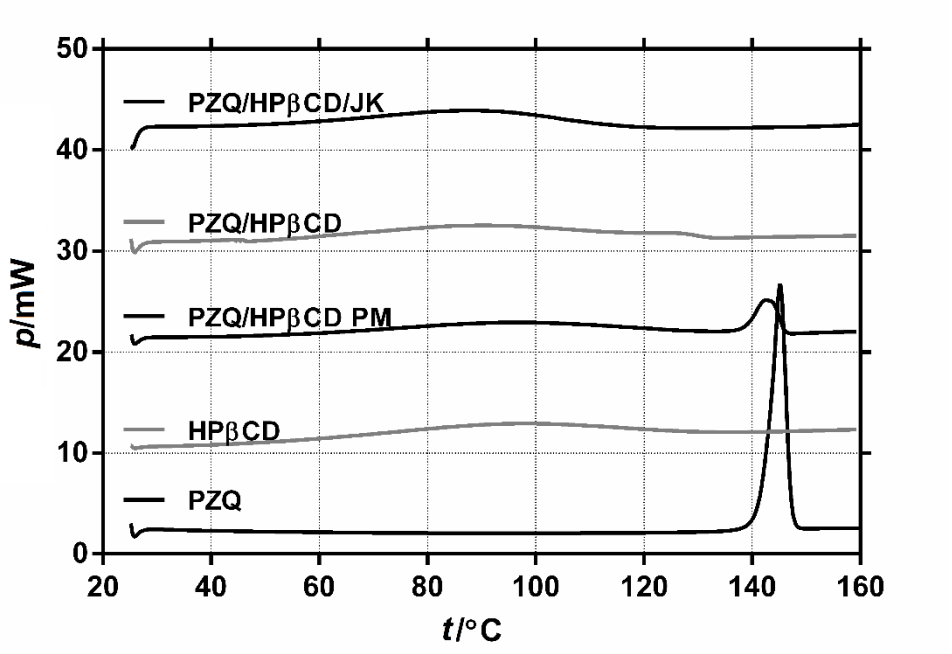
Slika 37. XRPD uzorak PZQ-a, hidroksi-β-ciklodekstrina (HPβCD) i njihov ekvimolarni mljeveni produkt pripremljen suhim mljevenjem (NG).



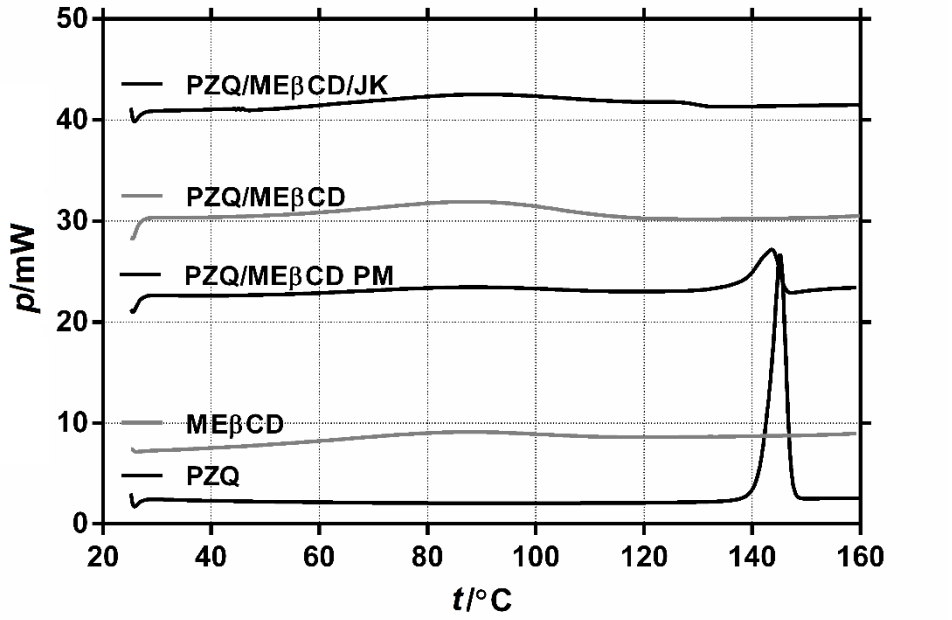
Slika 38. XRPD uzorak PZQ-a, metil-β-ciklodekstrina (MEβCD) i njihov ekvimolarni mljeveni produkt pripremljen suhim mljevenjem (NG).



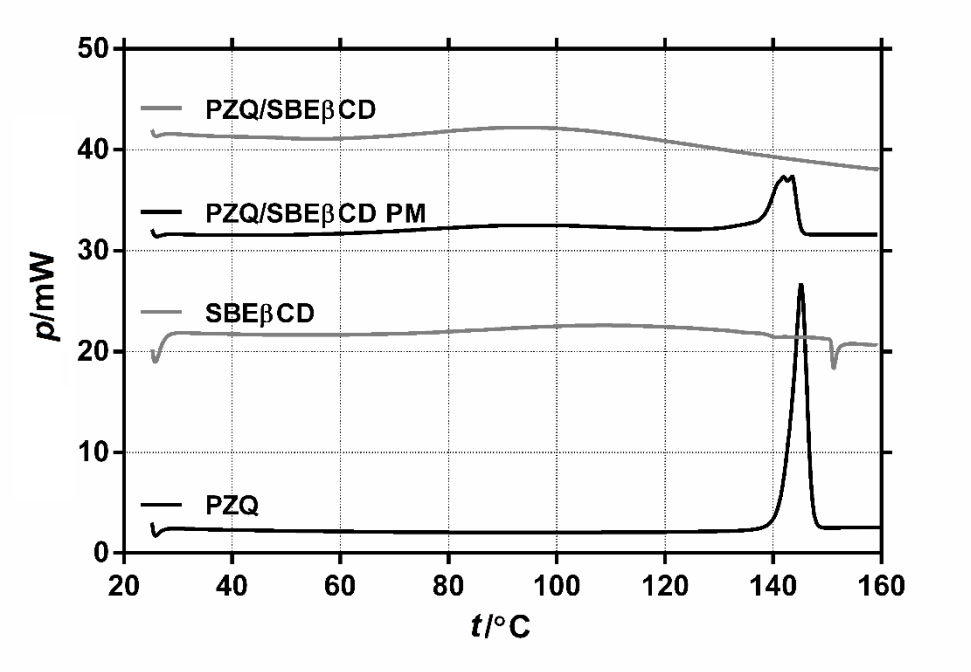
Slika 39. XRPD uzorak PZQ-a, sulfobutil-β-ciklodekstrina (SBEβCD) i njihov ekvimolarni mljeveni produkt pripremljen suhim mljevenjem (NG).



Slika 40. DSC termogram PZQ, hidroksi-β-ciklodekstrina (HPβCD), odgovarajuće fizičke smjese (PM) i mljevenog produkta u ekvimolarnom omjeru, kao i ternarnog mljevenog produkta u molarnom omjeru 1:1:1 sa HPβCD/JK pripremljenog suhim mljevenjem (NG).



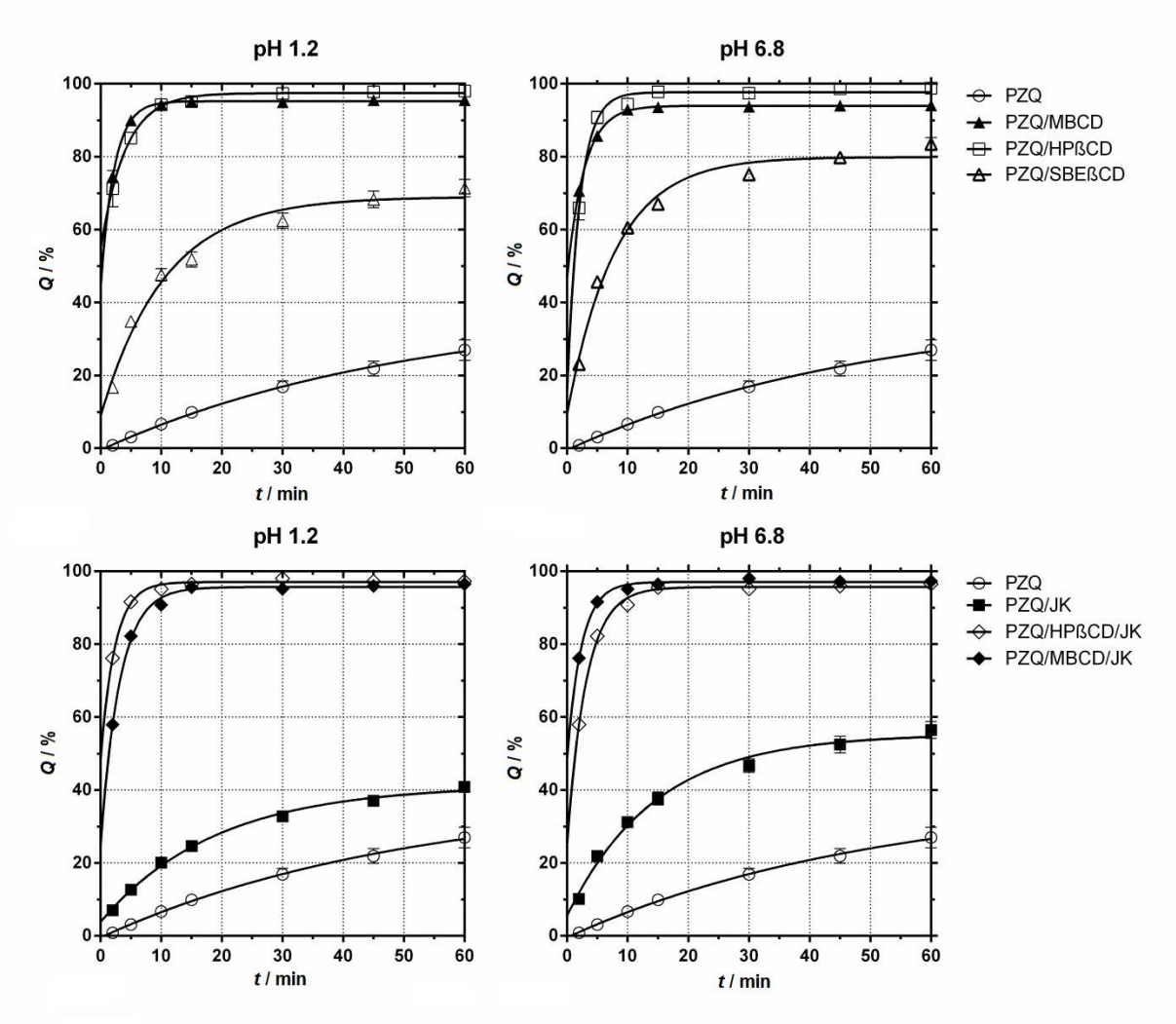
Slika 41. DSC termogram PZQ, metil-β-ciklodekstrina (MEβCD), odgovarajuće fizičke smjese (PM) i mljevenog produkta u ekvimolarnom omjeru, kao i ternarnog mljevenog produkta u molarnom omjeru 1:1:1 s MEβCD /JK pripremljenog suhim mljevenjem (NG).



Slika 42. DSC termogram PZQ, sulfobutil-β-ciklodekstrina (SBEβCD), odgovarajuće fizičke smjese (PM) i mljevenog produkta u ekvimolarnom omjeru pripremljenog suhim mljevenjem (NG).

4.5. *In vitro* ispitivanje oslobađanja prazikvantela

Oslobađanje djelatne tvari je proces u kojem djelatna tvar napušta čvrsti ljekoviti oblik (prašak, mikrokapsule, kapsule, tablete ili filmovi), otapa se te postaje dostupna za apsorpciju i farmakološki učinak. Stoga je navedeno ispitivanje od ključnog značaja u razvoju novih formulacija lijeka te u procjeni njihove učinkovitosti i kvalitete.[117] U ovom istraživanju, *in vitro* ispitivanje oslobađanja djelatne tvari iz odabranih uzoraka u umjetnom želučanom (pH 1,2) i crijevnom (pH 6,8) mediju, bez dodatka enzima provedeno je s ciljem dodatne procjene učinkovitost korištenih aditiva u procesu mljevenja na proces otapanja pripremljenih produkata. Kod lijekova kao što je PZQ, upravo je proces otapanja, odnosno oslobađanja lijeka iz formulacije prepoznat kao ključan korak koji utječe na brzinu nastupa djelovanja i oralnu bioraspoloživost lijeka.[8]



Slika 43. *In vitro* profili topljivosti odabranih mljevenih uzoraka u simuliranom želučanom (pH 1,2) i simuliranom crijevnom (pH 6,8) mediju na 37 °C. Za označavanje uzoraka pogledati tablicu 6.

Profili otapanja lijeka, odabranih kokristala te binarnih i ternarnih ciklodekstrinskih kompleksa prikazani su na slici 43. Pri tome, proces oslobađanja lijeka iz pripremljenih produkata pratio se s obzirom na postotak otopljenog lijeka u 15 minuta ($Q_{15\ min}$), koji je korišten kao indikator brzine otapanja lijeka, a temeljem vrijednosti parametra učinkovitost oslobađanja nakon 60 minuta ($DE_{60\ min}$) pratio se opseg procesa otapanja djelatne tvari.[118] Navedeni podaci prikazani su u tablici 7.

Tablica 7. Postotak otopljenog lijeka nakon 15 minuta ($Q_{15\ min}$) i učinkovitost oslobađanja lijeka u 60 minuta ($DE_{60\ min}$) izabranih mljevenih uzoraka u simuliranom želučanom (pH 1,2) i simuliranom crijevnom (pH 6,8) mediju pri 37 °C

Uzorak	pH 1,2		pH 6,8	
	$Q_{15\ min}$ (%)	$DE_{60\ min}$ (%)	$Q_{15\ min}$ (%)	$DE_{60\ min}$ (%)
PZQ	9,89 ± 0,71	15,49 ± 2,47	9,86 ± 0,58	15,62 ± 2,39
PZQ/JK	24,63 ± 3,06	29,35 ± 4,10	37,65 ±3,02	42,42 ±3,13
PZQ/HPβCD	95,09 ± 2,23	92,18 1 ±,09	97,78 ± 1,88	93,22 ± 0,74
PZQ/MEβCD	93,52 ± 0,39	91,11 ±0,11	95,15 ±0,45	92,48 ± 0,45
PZQ/SBEβCD	51,80 ± 3,61	56,93 ± 3,11	67,00 ±1,52	68,97 ± 1,67
PZQ/HPβCD/JK	94,61 ± 1,91	92,97 ± 1,77	95,57 ± 2,89	95,11 ± 0,55
PZQ/MEβCD/JK	96,44 ±1,45	90,26 ± 1,59	98,81 ± 1,33	92,16 ± 1,35

Proces otapanja lijeka u pravilu uključuje 5 koraka. U prvom koraku dolazi do močenja čestica produkta otapalom (medij za oslobađanje), nakon čega dolazi do pucanja kemijskih veza unutar kristalne rešetke te okruživanja pojedinačnih molekula/iona/atoma lijeka slojem molekula vode. Nakon toga solvatizirane pojedinačne molekule/ioni/atomi difundiraju s površine čestice lijeka kroz stacionarni sloj otapala blizu površine, a od tamo se prenose prema ostatku miješanog medija, gdje se slobodno gibaju.[117] Kao što je vidljivo iz prikazanih rezultata, proces otapanja PZQ je spor i nepotpun u promatranom vremenskom rasponu (Slika 43, Tablica 7), što pridonosi njegovoj niskoj oralnoj bioraspoloživosti.[8] Svi mljeveni produkti karakterizirani su značajno većom brzinom i opsegom otapanja lijeka u usporedbi sa onima čistog lijeka (p> 0,05; Tablica 6). Pri tome, uočeni stupanj povećanja brzine i opsega otapanja je povezan sa tipom korištenog aditiva u procesu mljevenja, kao i vrstom nastalog produkta. Kokristali PZQ-a s jabučnom kiselinom najmanje su učinkoviti u povećanju svojstva otapanja lijeka, a njihov učinak je neovisan o pH-vrijednosti medija u kojemu je provedeno ispitivanje (Tablica 7). Iako nastajanje PZQ/JK kokristala povećava topljivost lijeka, proces njegovog otapanja je spor i nepotpun, što se može pripisati nastajanju relativno stabilne kristalne rešetke kokristala, koja je stabilizirana vodikovim vezama kao što je prethodno objašnjeno. Naime, poznato je da su termodinamička stabilnost kristalne rešetke i

topljivost, kao i odgovarajuća brzina oslobađanja djelatne tvari nastalih kokristala u obrnutom odnosu.[111]

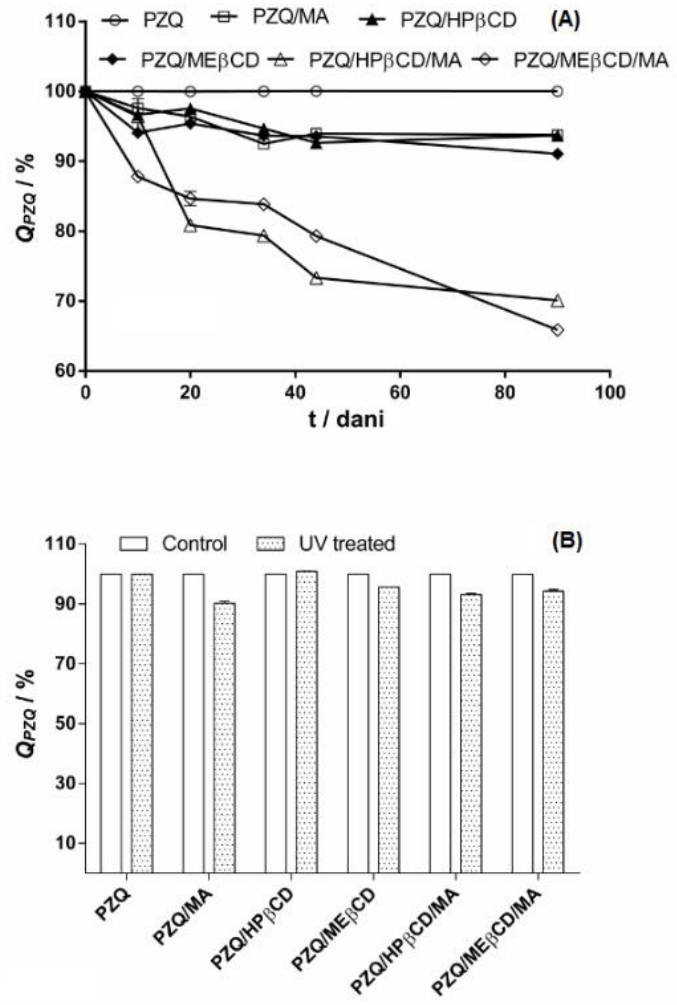
Binarni i ternarni ciklodekstrinski inkluzijski kompleksi učinkovitiji su u povećanju brzine i opsega otapanja PZQ u usporedbi s kokristalima s jabučnom kiselinom (Tablica 7) te prikazuju profil oslobađanja koji se u literaturi klasificira kao trenutačno.[119] Može se pretpostaviti da hidrofilne karakteristike ciklodekstrina pridonose močenju čestica produkta, a amorfna struktura kao i posljedično nastajanje inkluzijskih kompleksa značajno pridonose brzini otapanja, kao i dosegu tog procesa. Na svojstva *in vitro* oslobađanja lijeka iz pripremljenih uzoraka značajan utjecaj ima vrsta korištenog ciklodekstrina. Među ispitanim ciklodekstrinima, produkt pripremljen sa anionskim SBEβCD pokazuje najnepovoljnija svojstva otapanja, dok je *in vitro* oslobađanje lijeka kod kompleksa s HPβCD i MeβCD pripremljenih mljevenjem značajno brže i većeg opsega. Pri tome, oba ciklodekstrina pokazuju sličnu učinkovitost u povećanju brzine oslobađanja djelatne tvari lijeka uz vrijednosti $DE_{60\ \mathrm{min}}$ blizu 100% ($p < 0{,}05$; Tablica 7). Zbog vrlo niskih vrijednosti pK_a, skupine sulfonske kiseline u SBEβCD su negativno nabijene pri fiziološkim pH vrijednostima,[120] što smanjuje njegov afinitet za stvaranje inkluzijskih kompleksa sa PZQ-om, čime se smanjuje topljivost i brzina oslobađanja djelatne tvari nastalog produkta (Tablice 6 i 7). Zanimljivo je da *in vitro* oslobađanje lijeka kod PZQ/SBEβCD kompleksa pokazuje ovisnost o pH-vrijednosti medija u kojem je provedeno ispitivanje (Tablica 7). Takvo ponašanje nije bilo očekivano, uzimajući u obzir da topljivost mljevenog kompleksa PZQ / SBEβCD nije značajno varirala u medijima pH-vrijednosti 1,2; 4,5 i 6,8 (Tablica 6). Nadalje, *in vitro* profili oslobađanja kod binarnih i ternarnih kompleksa lijeka s HPβCD i MEβCD su usporedivi, a brzina oslobađanja lijeka kao ni opseg otapanja se ne razlikuju značajno ($p > 0{,}05$, Tablica 7). Ti podaci su u suprotnosti s podacima dobivenim pri određivanju topljivosti, koji pokazuju manju topljivost u slučaju ternarnih kompleksa (Tablica 6). Ternarni kompleksi sadrže lijek, ciklodekstrin i treću komponentu, te su stabilizirani slabim silama, uključujući i Van der Waalsove, elektrostatske i vodikove veze.[76] Moguće je da tijekom ispitivanja topljivosti ternarnih kompleksa, koje traje tijekom 24 sata, dolazi do disocijacije navedenih veza, čime se smanjuje topljivost takvog produkta. S druge strane, termodinamička stabilnost ternarnih kompleksa u mediju za *in vitro* oslobađanje djelatne tvari bila je dovoljna za osiguravanje visoke topljivost PZQ-a tijekom ograničenog vremenskog perioda od 60 minuta, tijekom kojih se provodila studija *in vitro* oslobađanja djelatne tvari. Nadalje, čini se da

dodatak jabučne kiseline u nekoj mjeri destabilizira interakciju između PZQ i ispitivanih derivata ciklodekstrina, vjerojatno kompetitivnim izmještanjem molekule lijeka iz središnje šupljine molekule ciklodekstrina, što slabi solubilizacijski potencijal HPβCD i MEβCD. Temeljem *in vitro* karakteristika oslobađanja lijeka, binarni kompleksi PZQ-a s HPβCD i MEβCD, čine se najprihvatljivijim za daljnje faze razvoja novih formulacija lijeka s trenutnim oslobađanjem lijeka.

4.6. Kemijska stabilnosti odabranih produkata

Kvaliteta, sigurnost i učinkovitost najvažniji su atributi farmaceutskih proizvoda. Zbog toga je neophodno detaljno ispitati kemijsku stabilnost produkata, kao i identificirati potencijalno prisutna onečišćenja i razgradne produkte koji bi mogli nastati tijekom roka valjanosti proizvoda.[12] Navedena ispitivanja provode se na djelatnoj tvari, svim međuproduktima u procesu proizvodnje te na gotovoj formulaciji u konačnom spremniku, a temelj su za registraciju novih lijekova. Detaljan pregled propisanih ispitivanja s uputama kako se ona provode dan je u ICH smjernicama (engl. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*), na kojima se temelje zahtjevi kvalitete farmaceutskih proizvoda većine nacionalnih, regionalnih i međunarodnih regulatornih tijela. Navedena istraživanja su izrazito opsežna, dugotrajna te zahtijevaju značajne financijske resurse i opremu ("CPMP/ICH/2736/99," n.d.).

U ovom istraživanju binarni i ternarni kompleksi PZQ-a sa HPβCD i MEβCD te kokristali s jabučnom kiselinom, kao produkti s prihvatljivim *in vitro* profilom oslobađanja, podvrgnuti su ispitivanju kemijske stabilnosti lijeka metodom ubrzanog starenja te ispitivanju fotostabilnosti, koji su provedeni u skladu s preporukama ICH smjernica za ispitivanje stabiliteta lijekova i gotovih farmaceutskih proizvoda. Cilj ove faze istraživanja je bio procijeniti utjecaj korištenih aditiva u procesu mljevenja na kemijsku stabilnost PZQ-a u odabranim uzorcima. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 44.



Slika 44. Promjene u koncentraciji PZQ-a u odabranim uzorcima tijekom ispitivanja kemijske stabilnosti lijeka metodom ubrzanog starenja na 40 ± 2 °C / 75 ± 5% RH (A) te tijekom ispitivanja fotostabilnosti (B).

Rezultati ispitivanja kemijske stabilnosti lijeka metodom ubrzanog starenja pokazuju da razgradnja PZQ-a u odabranim uzorcima prati kinetiku nultog reda, pri čemu su vrijednosti koeficijenta korelacije r^2 u rasponu od 0.918 do 0.986. U slučaju čistog PZQ-a, nagib dobivenog pravca nije statistički značajno različit od nule ($p > 0,05$), što potvrđuje kemijsku stabilnost ove djelatne tvari na njegovu stabilnost pri uvjetima ispitivanja (40 ± 2 °C/75 ± 5% RH) tijekom 90 dana (Slika 44 A). U slučaju svih ispitanih uzoraka pripremljenih mljevenjem uočena je značajna razgradnja PZQ-a. Odgovarajuće konstante brzine razgradnje za PZQ/JK, PZQ/HPβCD, PZQ/MEβCD, PZQ/HPβCD/JK i PZQ/MEβCD/JK iznosile su $(2,75 \pm 0,83)\times10^{-5}$, $(2,3 \pm 0,74)\times10^{-5}$, $(3,33 \pm 0,73)\times10^{-5}$, $(16,40 \pm 2,85)\times10^{-5}$ i $(17,23 \pm 1,63)\times10^{-5}$

h^{-1}. Nadalje, analizirani uzorci pokazali su različite stupnjeve fotorazgradnje (Slika 44 B). Pri tome, čisti lijek je opet najstabilniji, pokazujući statistički beznačajnu razinu razgradnje djelovanjem UV svjetla ($p > 0,05$). Sličan rezultat utvrđen je kod uzorka PZQ/HPβCD, dok su ostali ispitani produkti pokazali statistički značajnu razinu fotorazgradnje tijekom ispitivanog perioda ($p < 0,05$). Najistaknutija fotorazgradnja zabilježena je u slučaju PZQ/JK kokristala, rezultirajući razgradnjom otprilike 7,9% početne doze lijeka. Ostali uzorci pokazali su usporedive razine fotostabilnosti, uz razgradnju početne doze lijeka od 4,3% u slučaju kompleksa PZQ/MEβCD do 6,8% za ternarni kompleks PZQ/HPβCD/JK (Slika 44 B).

Prikazani rezultati, naročito oni zabilježeni u slučaju ispitivanih kompleksa s ciklodekstrinima su prilično iznenađujući s obzirom na činjenicu da velika većina publikacija pokazuje pozitivan učinak ciklodekstrina na kemijsku stabilnost i fotostabilnost različitih molekula.[121-125] Čini se da je učinak ciklodekstrina na kemijsku stabilnost lijeka povezan s načinom uklapanja lijeka u središnju šupljinu ciklodekstrina, tj. sa strukturom nastalog inkluzijskog kompleksa. Ukoliko je reaktivna skupina na kojoj se događa razgradnja molekule lijeka smještena u središnjoj šupljini molekule ciklodekstrina, nastajanje inkluzijskog kompleksa dovesti će do smanjenja brzine razgradnje lijeka, s obzirom da je reaktivna skupina zaštićena molekulom ciklodekstrina. Međutim, ukoliko se reaktivna skupina molekule lijeka nalazi izvan centralne šupljine ciklodekstrina, nastajanjem inkuzijskog kompleksa neće doći do poboljšanja kemijske stabilnosti lijeka. Štoviše, interakcije reaktivne funkcionalne skupine lijeka i supstituenata na jezgri molekule ciklodekstrina mogu dovesti do dodatne destabilizacije molekule lijeka te u tom slučaju ciklodekstrini kataliziraju kemijsku razgradnju lijeka.[70] Ovaj mehanizam mogao bi objasniti uočeni utjecaj ciklodekstrina na kemijsku stabilnost i fotostabilnost PZQ. Podaci dostupni u literaturi pokazuju da se nastajanje inkluzijskog kompleksa PZQ s βCD-om odvija smještanjem aromatskog dijela izokinolinskog prstena u strukturi molekule lijeka duboko u centralnu šupljinu ciklodekstrina.[80] S druge strane, dostupni podaci o mehanizmima termičke i fotokemijske razgradnje lijeka pokazuju da se reakcija odvija na pirazino-4-on dijelu molekule[126,127], koji nije zaštićen molekulom ciklodekstrina u strukturi kompleksa.[80] Može se pretpostaviti da PZQ stvara komplekse slične strukture i s derivatima βCD, te u nastalim kompleksima reaktivna skupina molekule lijeka na kojoj se događa razgradnja nije zaštićena molekulom ciklodekstrina. S obzirom da je reaktivna skupina PZQ smještena izvan centralne šupljine ciklodekstrina, može se pretpostaviti njena interakcija sa stupstituentima na molekuli

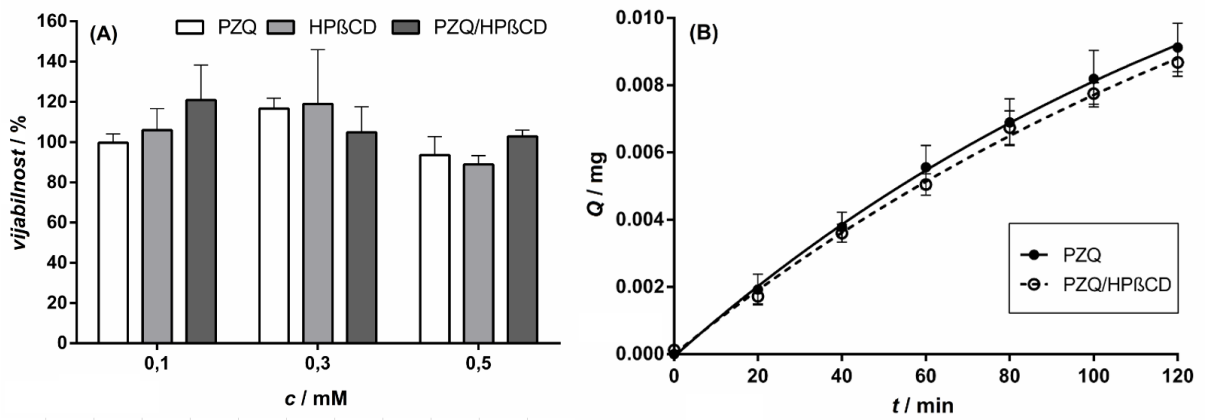
ciklodekstrina, što rezultira njihovim katalitičkim učinkom te izraženijom razgradnjom lijeka u slučaju navedenih kompleksa. Razlike u kemijskoj stabilnosti produkata s HPβCD i MEβCD mogu se pripisati većem afinitetu aktivirane molekule lijeka za interakciju sa više lipofilnom metilnom skupinom u strukturi MEβCD, što rezultira izraženijim katalitičkim efektom MEβCD na kemijsku razgradnju lijeka (Slika 44 B) .

Također, čini se da interakcija JK sa PZQ-om u nastalom kokristalu destabilizira molekulu lijeka, čineći je osobito sklonoj razgradnji (Slika 44 B). Konačno, JK i oba ciklodekstrina čini se da imaju sinergističko djelovanje na destabilizaciju PZQ, što rezultira izraženijom degradacijom odgovarajućih ternarnih komplekasa u usporedbi s binarnim (Slika 44 A). Stoga, ternarni kompleksi te kokristali s jabučnom kiselinom s obzirom na njihovu stabilnost nisu prikladni za farmaceutsku primjenu, a mljeveni kompleks PZQ/HPβCD čini se najprikladnijim za daljnji razvoj novih formulacija lijeka, s obzirom na *in vitro* profil oslobađanja te prihvatljivu kemijsku stabilnost.

4.7. Biokompatibilnost i *in vitro* studije permeabilnosti

Većina farmaceutski značajnih ciklodekstrina slabo se apsorbira iz probavnog trakta, s oralnom bioraspoloživosti uglavnom manjom od 4%. To pridonosi njihovoj dobroj podnošljivosti i biokompatibilnosti te odsustvu značajnije sistemske toksičnosti. Ovakav sigurnosni profil pripisuje se razgradnji ciklodekstrina djelovanjem crijevne mikroflore te njihovoj visokoj molekulskoj masi u rasponu od 973 do 2163 kDa, velikom broju skupina s potencijalom za stvaranje vodikovih veza, kao i visokoj hidrofilnost s $\log K_{o/w}$ između –8 i –12. Navedene karakteristike nepovoljno utječu na apsorpciju ciklodekstrina u probavnom sustavu, što rezultira njihovoj niskoj sistemskoj bioraspoloživosti. Uz to, apsorbirana frakcija ciklodekstrina se brzo izlučuje iz organizma glomerularnom filtracijom u bubrezima.[70] Međutim, ciklodekstrini mogu stupati u interakcije s komponentama staničnih membrana sluznice crijeva, ekstrahirajući lipide i kolesterol. Uklanjanje staničnih komponenata slabi barijernu ulogu stanične membrane te može rezultirati povećanjem apsorpcije primijenjenog lijeka, ali dovesti i do lokalne iritacije tkiva te oštećenja.[128-130] Budući da je biokompatibilnost produkta ključna značajka za daljnju primjenu u farmaciji, ispitan je utjecaj PZQ, HPβCD i PZQ/HPβCD kompleksa pripremljenog mljevenjem na vijabilnost Caco-2 kulture stanica, a metabolička aktivnost stanica mjerena je MTT testom. Caco-2 stanice su epitelne stanice

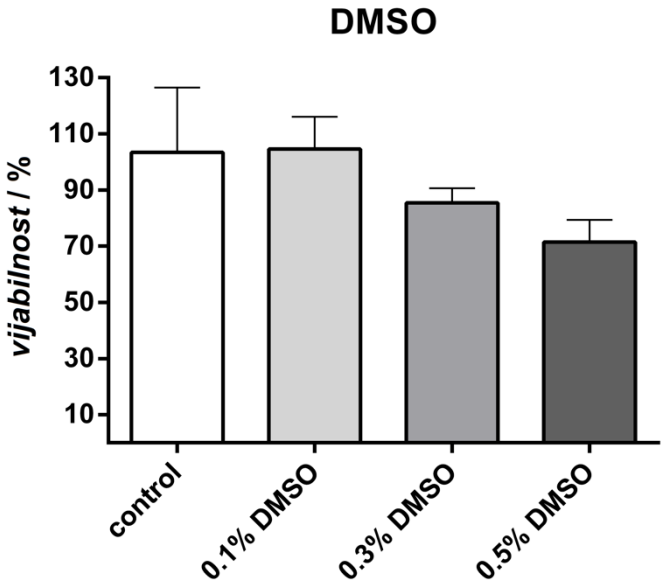
humanog adenokarcinoma debelog crijeva te se često koriste u procjeni biokompatibilnosti novih lijekova i formulacija.[14] *In vitro* model Caco-2 stanica je jednostavan, provodi se na mikrotitarskim pločicama s 96 jažica, čime je omogućeno ispitivanje i brzi probir velikog broja uzoraka.[131] Rezultati provedenog istraživanja su prikazani na slici 45A.



Slika 45. Utjecaj PZQ, HPβCD i mljevenog produkta PZQ/HPβCD na vijabilnost Caco-2 stanica određen MTT testom (A). Vrijeme inkubacije stanica iznosilo je 2 sata, a koncentracija ispitivanih uzoraka varirala je u rasponu od 0,1 do $0{,}5\times10^{-3}$ mol L^{-1}. *In vitro* profili permeabilnosti PZQ-a iz ispitivanih uzoraka nanesenih na Caco-2 stanični monosloj u koncentraciji od $0{,}1\times10^{-3}$ mol L^{-1} (B).

Općenito, tretiranje Caco-2 stanica otopinama PZQ, HPβCD ili PZQ/HPβCD kompleksa u rasponu koncentracija od 0,1-$0{,}5\times10^{-3}$ mol L^{-1} nije značajnije utjecalo na vijabilnost stanica ($p>0{,}05$, Slika 45 A), koja je uvijek bila visoka, u rasponu od 98,24 do 113,2%, što nedvojbeno upućuje na biokompatibilnost ispitanih uzoraka u testiranom rasponu koncentracija. Naime, prema ISO normama za *in vitro* ispitivanje biokompatibilnosti medicinskih proizvoda (ISO 10993-5:2009), vijabilnost tretiranih stanica viša od 80% smatra se pokazateljem potpune netoksičnosti ispitivanog uzorka (ISO 10993-5, 2009). U stvari, u prisutnosti HPβCD-a i PZQ/HPβCD kompleksa pri koncentraciji od 0,1 i $0{,}3\times10^{-3}$ mol L^{-1} te PZQ-a pri koncentraciji $0{,}3\times10^{-3}$ mol L^{-1} opaženo je povećanje vijabilnosti stanica iznad 100%, ali taj porast nije statistički značajan u usporedbi s vijabilnosti netretiranih stanica ($p > 0{,}05$). S obzirom da je za pripremu testnih otopina lijeka bila nužna uporaba DMSO kao

otapala, ispitan je i njegov utjecaj na vijabilnost Caco-2 kulture stanica. U tu svrhu primjenom MTT testa pratila se vijabilnost stanica tretiranih DMSO u rasponu koncentracija od 0,1 do 0,5% (v/v), što odgovara koncentracijama ovog otapala u testnim otopinama. Pri tome, nije zamijećen značajniji utjecaj ovog otapala na vijabilnost stanica (Slika 46), što je u skladu s podacima iz literature.[132]



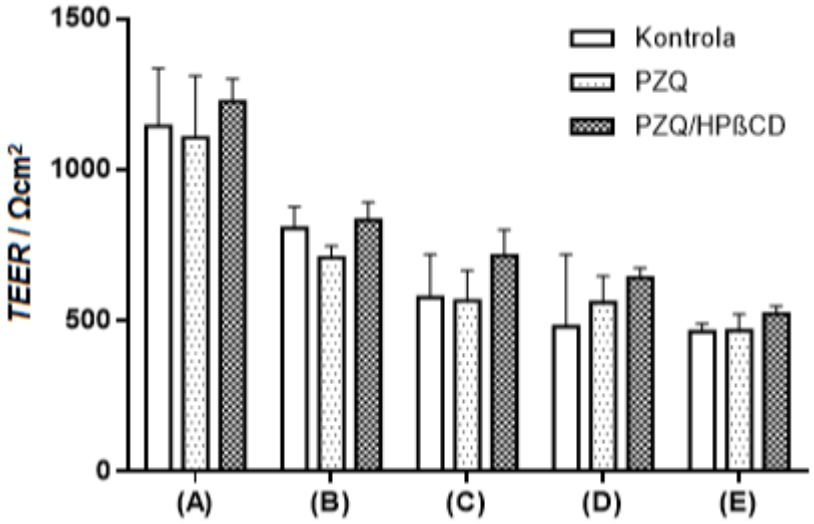
Slika 46. Utjecaj dimetilsulfoksida korištenog kao otapalo tijekom pripreme testnih otopina na vijabilnost Caco-2 stanica određen MTT testom. U ovom ispitivanju HBSS je korišten kao negativna kontrola.

Rezultat MTT testa vijabilnosti kulture Caco-2 stanica omogućio je optimiranje eksperimentalnih uvjeta za provođenje *in vitro* ispitivanja permeabilnosti lijeka na Caco-2 monosloju stanica, koje je provedeno nanošenjem otopina ispitivanih uzoraka (PZQ i PZQ/HPβCD) u koncentraciji od $0{,}1\times10^{-3}$ mol L^{-1}. Monoslojevi Caco-2 kulture stanica danas predstavljaju zlatni standard u istraživanju apsorpcije lijekova i drugih ksenobiotika zbog njihove sličnosti s intestinalnom barijerom crijeva, s obzirom na morfološke karakteristike, polarnost te način ekspresije transportera i enzima.[133] Jedina značajnija funkcionalna razlika Caco 2 staničnog monosloja i normalnih epitelnih stanica tankog crijeva je u nedostatku ekspresije nekih CYP 450 izoenzima, naročito CYP3A4, koji pokazuje izraženu aktivnost u normalnim epitelnim stanicama tankog crijeva. Međutim, ekspresija navedenog enzima u kulturi Caco 2 stanica može se potaknuti njegovim tretiranjem vitaminom D3.[134] Nadalje,

ovaj model može se također koristiti za istraživanje mehanizma transporta lijeka kroz intestinalnu sluznicu, kao i za procjenu utjecaja različitih terapijskih sustava na proces apsorpcije lijeka.[13] Zbog toga, tijekom eksperimenta se pratila i vrijednost transmembranskog otpora epitela (TEER), kako bi se procijenio potencijalni učinak HPβCD na otvaranje čvrstih međustaničnih spojeva, što bi moglo značajno pridonijeti transportu lijeka kroz intestinalnu membranu. Naime, literaturni podaci pokazuju da ciklodekstrini mogu djelovati kao promotori permeacije/apsorpcije lijekova, djelujući na povećanje permeabilnosti staničnih membrana zbog ekstrakcije njihovih lipidnih sastavnica te dovodeći do otvaranja čvrstih međustaničnih spojeva, struktura koje osiguravaju tijesnu adherenciju susjednih stanica u intestinalnoj membrani. Navedeni učinak u pravilu ovisi o vrsti primijenjenog ciklodekstrina, kao i o njegovoj koncentraciji.[135,136]

In vitro profili permeabilnosti PZQ preko Caco-2 monosloja prikazani su na slici 45 B, a temeljem njih određeni su koeficijenti permeabilnosti lijeka preko Caco-2 monosloja. Vrijednost koeficijenta permeabilnosti (P_{APP}) za čisti PZQ-a iznosi $(3{,}72 \pm 0.33)\times10^{-5}$ cm s^{-1}, što potvrđuje visoku permeabilnost PZQ na ispitivanom modelu, te je u skladu s literaturnim podacima.[8] Naime, prema biofarmaceutskom sustavu klasifikacije lijekova (engl. *Biopharmaceutical Classification System*, BCS) vrijednosti $P_{APP} > 10^{-5}$ cm s^{-1} smatraju se indikatorom dobre intestinalne permeabilnosti lijeka.[137] Iako je vrijednost P_{APP} PZQ preko Caco-2 monosloja koju su odredili Dinora i sur. ($4{,}4\times10^{-5}$ s cm^{-1}) nešto veća od one određene u ovom ispitivanju, uočeno neslaganje među rezultatima može se objasniti činjenicom da su navedeni autori za pripremu otopina ispitivanih uzoraka koristili etanol kao otapalo za teško topljivi lijek, a etanol dokazano doprinosi permeabilnosti lijekova preko Caco-2 monosloja.[138] U slučaju mljevenog produkta PZQ/HPβCD, može se zamijetiti smanjenje transporta lijeka preko Caco-2 staničnog monosloja (Slika 45B), a P_{APP} za taj uzorak iznosi $(3{,}65 \pm 0{,}21)\times10^{-5}$ s cm^{-1}. Iako je P_{APP} vrijednost za PZQ/HPβCD kompleks pripremljen mljevenjem nešto niža u odnosu na onu za čisti lijek, navedena razlika nije statistički značajna ($p>0{,}05$). Ovaj rezultat u skladu je sa rezultatima prethodnih istraživanja, koji pokazuju da nastajanje kompleksa talidomida HPβCD neće značajnije utjecati na transport lijeka kroz Caco-2 stanični monosloj.[139] U prilog tom zaključku govore i vrijednosti TEER zabilježene tijekom *in vitro* ispitivanja permeabilnosti lijeka (Slika 47). Naime, praćenje vrijednosti TEER je naširoko prihvaćena tehnika kvantitativne procjene integriteta čvrstih međustaničnih spojeva te potvrđuje nastanak koherentnog staničnog monosloja. Provodi se mjerenjem električnog

otpora staničnog monosloja korištenjem odgovarajuće elektrode, a pri tome integritet slojeva i vijabilnost stanica ostaju očuvane.[140] Vrijednosti TEER Caco-2 staničnog monosloja u hranjivom mediju 22 dana nakon nasađivanja kreću se u rasponu od 1145 – 1226 ohm cm^2, a navedene vrijednosti su u skladu s literaturnim podacima i smatraju se pokazateljem formiranja koherentnog staničnog monosloja.[141]



Slika 47. Promjene transepitelnog otpora (TEER) Caco-2 staničnog monosloja tijekom *in vitro* ispitivanja permeabilnosti: TEER Caco-2 monosloja u hranidbenom mediju na dan provođenja pokusa (A), TEER Caco-2 monosloja nakon uklanjanja hranidbenog medija i izlaganja HBSS-u (B) te TEER Caco-2 monosloja 30 (C), 60 (D) i 120 (E) minuta nakon izlaganja otopinama ispitivanih uzoraka.

Uklanjanje hranidbenog medija i njegova zamjena HBSS-om, koji je korišten kao medij tijekom *in vitro* ispitivanja permeabilnosti lijeka kroz Caco-2 stanični monosloj, dovelo je do smanjenja TEER-a, s obzirom da je navedeni pufer nepovoljniji medij za stanice u odnosu na sastav mnogo kompleksnijeg hranidbenog medija. Osim toga, TEER vrijednosti kontrolnih uzoraka (stanica tretiranih samo HBSS-om) tijekom ispitivanja pokazuju daljnji trend smanjenja (Slika 47). Slično ponašanje opaženo je i za Caco-2 monoslojeve koji su bili tretirani otopinama ispitivanih uzoraka u HBSS-u. Pri tome, Caco-2 monoslojevi tretirani otopinom kompleksa PZQ/HPβCD pokazuju čak i nešto veće vrijednosti TEER-a u odnosu na

kontrolne uzorke, no opažena razlika nije statistički značajna ($p>0,05$). Navedeni rezultat ukazuje da HPβCD u ispitanom rasponu koncentracija nije doveo do otvaranja čvrstih međustaničnih spojeva u Caco-2 monosloju te da ciklodekstrini ne pridonose aktivno transepitalnom transportu PZQ. Stoga, da bi lijek bio dostupan za transport preko Caco-2 staničnog monosloja, najprije mora doći do oslobađanja lijeka iz kompleksa, s obzirom da ciklodekstrini zbog svojih fizikalno-kemijskih karakteristika prolaze stanični monosloj u izrazito ograničenom opsegu, kao što je već ranije opisano. Iz toga proizlazi da će nastajanje kompleksa visoke stabilnosti nepovoljno utjecati na transepitelni transport lijeka.[135] Međutim, nastajanjem kompleksa umjerene stabilnosti, što je slučaj za PZQ/HPβCD kompleks konstante stabilnosti od 642 mol^{-1} L,[83] interakcija između lijeka i nosača biti će dovoljna da se osigura učinkovito otapanje lijeka, no neće ograničavati disocijaciju kompleksa i time njegov transport kroz Caco-2 stanični monosloj.

5. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenih istraživanja, dobivenih rezultata i njihove diskusije moguće je donijeti sljedeće zaključke:

Mljevenje PZQ s polimerima (hipromeloza, povidon i kopovidon) rezultira fizički nestabilnim uzorcima u kojima inicijalno amorfni lijek rekristalizira, a povećanje topljivosti lijeka je neznatno, zbog čega navedeni tip uzoraka nema veći potencijal za farmaceutsku primjenu.

Mljevenje potpomognuto tekućinom rezultiralo je uspješnom sintezom kokristala PZQ s jabučnom, vinskom, limunskom i salicilnom kiselinom. Pri tome kokristali s limunskom, jabučnom i vinskom kiselinom pokazuju bolju topljivost u odnosu na sam lijek, dok je nastajanje kokristala sa salicilnom kiselinom nepovoljno utjecalo na topljivost lijeka. S obzirom da kokristali PZQ s jabučnom kiselinom su najtopljiviji, uključeni su u daljnju fazu istraživanja.

Mljevenje korištenjem ciklodekstrina kao aditiva pokazalo se najučinkovitijim u povećanju topljivosti lijeka. Pri tome, njihov učinak je ovisio o korištenom derivatu te je najizraženiji porast topljivosti lijeka zabilježen kod amorfnih produkata PZQ s HPβCD i MEβCD. Nadalje, mljevenjem su uspješno pripremljeni i ternarni kompleksi lijeka sa HPβCD ili MEβCD i jabučnom kiselinom, no oni pokazuju manju topljivost u odnosu na odgovarajuće binarne, a očekivani sinergizam CD i jabučne kiseline u povećanju topljivosti lijeka je izostao. Bez obzira na to, navedeni binarni i ternarni kompleksi značajno povećavaju *in vitro* brzinu i opseg otapanja lijeka, što ih čini prikladnim za farmaceutsku primjenu. U tom smislu, kompleksi pripremljeni mljevenjem PZQ sa SBEβCD te kokristali s jabučnom kiselinom su manje učinkoviti.

Ispitivanja kemijske stabilnosti i fotostabilnosti odabranih uzoraka upućuju na nepovoljan učinak ispitivanih ciklodekstrina i jabučne kiseline na kemijsku stabilnost djelatne tvari, a od analiziranih uzoraka jedino PZQ/HPβCD kompleks pokazuje prihvatljivu stabilnost. Navedeni produkt je biokompatibilan te ne pokazuje nepovoljan utjecaj na *in vitro* permeabilnost lijeka preko Caco-2 staničnog monosloja. Izražena topljivost, odgovarajuća kemijska stabilnost i pokazana biokompatibilnost čine PZQ/HPβCD kompleks pripremljen

mljevenjem produktom od farmaceutskog značaja, koji je prikladan za daljni razvoj naprednih formulacija ovog lijeka.

6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

$\partial Q/\partial t$– brzina permeacije

A – površina difuzije monosloja

ANOVA – test analize varijance

ATR spektroskopija – metoda prigušene totalne refleksije

AUC – površina ispod krivulje

c_0– početna koncentracija lijeka

CD – ciklodekstrin

Cmax – maksimalna koncentracija lijeka

CPVP – kopovidon

DE_{60min}– učinkovitost oslobađanja lijeka nakon 60 minuta

DMSO – dimetilsulfoksid

DMβCD – dimetil–β-CD

DSC – diferencijalna pretražna kalorimetrija

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

FTIR – infracrvenaspektroskopija

HEβCD – hidroksietil–β-CD

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

HPMC – hipromeloza

HPMCAS – hidroksipropil metilceluloza acetat sukcinat

HPβCD – hidroksipropil–β-CD

HPγCD – hidroksipropil-γ-CD

JK – jabučna kiselina

LAG – mljevenje uz dodatak otapala

LK – limunska kiselina

LMH – laktoza monohidrat

MEβCD – metil–β-CD

MTT test – test praćenja vijabilnosti tretiranih stanica

NG – suho mljevenje

P_{APP} -prividni koeficijent permeabilnosti lijeka

PEG – polietilenglikol

Pgp – P-glikoprotein

PLGA – kopolimer mliječne i glikolne kiseline

PM – fizička smjesa

PVP – polivinilpirolidon

PVP – povidon

PXT – paklitaksel

PZQ – prazikvantel

Q – postotak otopljenog lijeka

SBEβCD – sulfobutil–β-CD

SBEγCD – sulfobutileter-γ-CD

SCF – superktitični fluid

SK – salicilna kiselina

t – vrijeme otapanja lijeka

$T_{1/2}$ – poluvrijeme eliminacije

TEER – transepitelni električni otpor

Tg – temperatura staklastog prijelaza lijeka

TMβCD – trimetil–β-CD

VK – vinska kiselina

WHO – World Health Organization

XRPD – rentgenska difrakcija praškastog uzorka

7. LITERATURNI IZVORI

1. A. L. Bustinduy, S. Wright, E. C. Joekes, N. B. Kabatereine, J. Reinhard-Rupp, C. H. King i J. R. Stothard, One hundred years of neglect in paediatric schistosomiasis, *Parasitology* **144(12)** (2017) 1613–1623.
2. R. Trastullo, L. S. Dolci, N. Passerini i B. Albertini, Development of flexible and dispersible oral formulations containing praziquantel for potential schistosomiasis treatment of pre-school age children, *Int. J. Pharm*. **495(1)** (2015) 536–550.
3. N. Vale, M. J. Gouveia, G. Rinaldi, P. J. Brindley, F. Gärtner i J. M. Correia da Costa, Praziquantel for Schistosomiasis: Single-Drug Metabolism Revisited, Mode of Action, and Resistance, *Antimicrob. Agents Chemother*. **61(5)** (2017).
4. Z. H. Wu, M. ke Lu, L. Y. Hu i X. Li, Praziquantel Synergistically Enhances Paclitaxel Efficacy to Inhibit Cancer Cell Growth, *PLoS ONE* **7(12)** (2012).
5. R. Hayeshi, C. Masimirembwa, S. Mukanganyama i A. L. B. Ungell, The potential inhibitory effect of antiparasitic drugs and natural products on P-glycoprotein mediated efflux, *Eur. J. Pharm. Sci.* **29(1)** (2006) 70–81.
6. E. D. Costa, J. Priotti, S. Orlandi, D. Leonardi, M. C. Lamas, T. G. Nunes i M. J. Ferreira, Unexpected solvent impact in the crystallinity of praziquantel/poly(vinylpyrrolidone) formulations. A solubility, DSC and solid-state NMR study, *Int. J. Pharm*. **511(2)** (2016) 983–993.
7. H. Jung, M. Hurtado, M. Sanchez, M. T. Medina i J. Sotelo, Plasma and CSF levels of albendazole and praziquantel in patients with neurocysticercosis, *Clin. Neuropharmacol.* **13(6)** (1990) 559–564.
8. G. E. Dinora, R. Julio, C. Nelly, Y. M. Lilian i H. J. Cook, In vitro characterization of some biopharmaceutical properties of praziquantel, *Int. J. Pharm*. **295(1–2)** (2005) 93–99
9. Z. H. Loh, A. K. Samanta i P. W. Sia Heng, Overview of milling techniques for improving the solubility of poorly water-soluble drugs, *Asian J. Pharm. Sci.* **10(4)** (2014) 255–274.
10. D. Tan, L. Loots i T. Friščić, Towards medicinal mechanochemistry: Evolution of milling from pharmaceutical solid form screening to the synthesis of active pharmaceutical ingredients (APIs), *Chem. Comm.* **52(50)** (2016) 7760–7781.

11. Y. Guo, E. Shalaev i S. Smith, Physical stability of pharmaceutical formulations: Solid-state characterization of amorphous dispersions, *TrAC, Trends Anal. Chem.* **49** (2013) 137–144.
12. R. M. Maggio, S. E. Vignaduzzo i T. S. Kaufman, Practical and regulatory considerations for stability-indicating methods for the assay of bulk drugs and drug formulations, *TrAC, Trends Anal. Chem.* **49** (2013) 57–70.
13. I. Hubatsch, E. G. E. Ragnarsson i P. Artursson, Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers, *Nat. Protoc.* **2(9)** (2007) 2111–2119.
14. J. C. Stockert, A. Blázquez-Castro, M. Cañete, R. W. Horobin i Á. Villanueva, MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets, *Acta Histochem.* **114(8)** (2012) 785–796.
15. S. Wright, N. B. Kabatereine, C. H. King, A. L. Bustinduy, J. R. Stothard, E. C. Joekes i J. Reinhard-Rupp, One hundred years of neglect in paediatric schistosomiasis, *Parasitology* **144(12**) (2017) 1613–1623.
16. R. Bergquist, J. Utzinger i J. Keiser, Controlling schistosomiasis with praziquantel: How much longer without a viable alternative, *Infect. Dis. Poverty* **6(1)** (2017) 1–10.
17. J. Li, Y. Wang, A. Fenwick, T. A. Clayton, Y. Y. K. Lau, C. Legido-Quigley i E. Holmes, A high-performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopy-based analysis of commercially available praziquantel tablets, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **45(2)** (2007) 263–267.
18. World Health Organization, *WHO model prescribing information: drugs used in parasitic diseases*, Hong Kong: World Health Organization, 2nd ed. (1995).
19. M. J. Doenhoff, D. Cioli i J. Utzinger, Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis, *Curr. Opin. Infect. Dis*. **21(6)** (2008) 659–667.
20. T. Meyer, H. Sekljic, S. Fuchs, H. Bothe, D. Schollmeyer i C. Miculka, Taste, a new incentive to switch to (R)-praziquantel in schistosomiasis treatment, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3(1)** (2009) 3–7.
21. D. Zanolla, G. Zingone, D. Voinovich, N. Passerini, R. Trastullo, B. Albertini i J. Keiser, An explorative analysis of process and formulation variables affecting comilling in a vibrational mill: The case of praziquantel, *Int. J. Pharm*. **533(2)** (2017)

402–412.

22. B. Albertini, B. Perissutti, S. Bertoni, D. Zanolla, E. Franceschinis, D. Voinovich i N. Passerini, Combining mechanochemistry and spray congealing for new praziquantel pediatric formulations in schistosomiasis treatment, *Int. J. Mol. Sci.* **20(5)** (2019).
23. WHO, Praziquantel 600mg Tablets (Cipla Ltd), NT003 WHOPAR Part 4 January 2017, Retrieved from, (January) (2017).
24. J. Zwang i P. Olliaro, Efficacy and safety of praziquantel 40 mg/kg in preschool-aged and school-aged children: A meta-analysis, *Parasite. Vector*. **10(1)** (2017) 1–16.
25. M. Kabuyaya, M. J. Chimbari i S. Mukaratirwa, Efficacy of praziquantel treatment regimens in pre-school and school aged children infected with schistosomiasis in sub-Saharan Africa: A systematic review, *Infect. Dis. Poverty* **7(1)** (2018) 1–7.
26. A. Garba, M. S. Lamine, A. Djibo, A. Tahirou, M. A. Aouami, A. Alfari i J. Utzinger, Safety and efficacy of praziquantel syrup (Epiquantel®) against Schistosoma haematobium and Schistosoma mansoni in preschool-aged children in Niger, *Acta Trop.* **128(2)** (2013) 318–325.
27. A. D. Dayan, Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics, *Acta Trop.* **86(2–3)** (2003) 141–159.
28. M. Woelfle, J. P. Seerden, J. de Gooijer, K. Pouwer, P. Olliaro i M. H. Todd, Resolution of praziquantel, *PLoS Negl Trop Dis.* **5(9)** (2011) 1–7.
29. C. E. Lanusse, G. L. Virkel i L. I. Alvarez, Anticestodal and antitrematodal drugs. In J. E. Riviere & M. G. Papich (Eds.), *Veterinary pharmacology & therapeutics*, Hoboken: Wiley-Blackwell, (9th ed., pp. 1095–1117) (2009).
30. P. M. Cupit i C. Cunningham, What is the mechanism of action of praziquantel and how might resistance strike, *Future Med. Chem.* **7(6)** (2015) 701–705.
31. W. M. Bagchus, D. Bezuidenhout, E. Harrison-Moench, E. Kourany-Lefoll, P. Wolna, P. i O. Yalkinoglu, Relative Bioavailability of Orally Dispersible Tablet Formulations of Levo- and Racemic Praziquantel: Two Phase I Studies, *Clin. Transl. Sci.* **12(1)** (2019) 66–76.
32. C. Rodriguez-Antone, Pharmacogenomics of paclitaxel Commentary, *Pharmacogenomics J.* **11(5)** (2010) 621–623.
33. E. Eyoh, P. McCallum, J. Killick, S. Amanfo, F. Mutapi i A. L. Astier, The anthelmintic drug praziquantel promotes human Tr1 differentiation, *Immunol. Cell*

Biol. **97(5)** (2019) 512–518.

34. M. Rodriguez-Aller, D. Guillarme, J. L. Veuthey i R. Gurny, Strategies for formulating and delivering poorly water-soluble drugs, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **30** (2015) 342–351.
35. F. Meng, U. Gala i H. Chauhan, Classification of solid dispersions: correlation to (i) stability and solubility (ii) preparation and characterization techniques, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **41(9)** (2015) 1401–1415.
36. D. Q. M. Craig, The mechanisms of drug release from solid dispersions in water-soluble polymers, *Int. J. Pharm.* **231(2)** (2002) 131–144.
37. D. K. Mishra, V. Dhote, A. Bhargava, D. K. Jain i P. K. Mishra, Amorphous solid dispersion technique for improved drug delivery: basics to clinical applications, *Drug Deliv. Transl. Res.* **5(6)** (2015) 552–565.
38. R. T. Y. Lim, W. K. Ng i R. B. H. Tan, Dissolution enhancement of indomethacin via amorphization using co-milling and supercritical co-precipitation processing, *Powder Technol.* **240** (2013) 79–87.
39. M. Descamps, J. F. Willart, E. Dudognon i V. Caron, Transformation of Pharmaceutical Compounds upon Milling and Comilling: The Role of Tg, *J. Pharm. Sci.* **96(5)** (2007) 1398–1407.
40. J. F. Willart i M. Descamps, ChemInform Abstract: Solid State Amorphization of Pharmaceuticals, *ChemInform* **40(3**) (2008) 905–920.
41. A. Karataş, N. Yüksel i T. Baykara, Improved solubility and dissolution rate of piroxicam using gelucire 44/14 and labrasol, *Farmaco* **60(9)** (2005) 777–782.
42. B. Lang, J. W. McGinity i R. O. Williams, Hot-melt extrusion-basic principles and pharmaceutical applications, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **40(9)** (2014) 1133–1155.
43. P. Dani, V. Puri i A. K. Bansal, Solubility advantage from amorphous etoricoxib solid dispersions, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **40(1)** (2014) 92–101.
44. E. Karavas, G. Ktistis, A. Xenakis i E. Georgarakis, Effect of hydrogen bonding interactions on the release mechanism of felodipine from nanodispersions with polyvinylpyrrolidone, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **63(2)** (2006) 103–114.
45. M. T. Marín, M. V. Margarit i G. E. Salcedo, Characterization and solubility study of solid dispersions of flunarizine and polyvinylpyrrolidone, *Farmaco* **57(9)** (2002) 723–727.

46. J. Desai, K. Alexander i A. Riga, Characterization of polymeric dispersions of dimenhydrinate in ethyl cellulose for controlled release, *Int. J. Pharm*. **308(1–2)** (2006) 115–123.
47. K. Dhirendra, S. Lewis, N. Udupa i K. Atin, Solid dispersions: a review, *Pakistan J. Pharm. Sci.* **22(2)** (2009) 234–246.
48. S. Janssens, A. De Zeure, A. Paudel, J. Van Humbeeck, P. Rombaut i G. Van Den Mooter, Influence of preparation methods on solid state supersaturation of amorphous solid dispersions: A case study with itraconazole and eudragit E100, *Pharm. Res*. **27(5)** (2010) 775–785.
49. Y. Kojima, T. Ohta, K. Shiraki, R. Takano, H. Maeda i Y. Ogawa, Effects of spray drying process parameters on the solubility behavior and physical stability of solid dispersions prepared using a laboratory-scale spray dryer, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **39(9)** (2013) 1484–1493.
50. H. H. Y. Tong, Z. Du, G. N. Wang, H. M. Chan, Q. Chang, L. C. M. Lai i Y. Zheng, Spray freeze drying with polyvinylpyrrolidone and sodium caprate for improved dissolution and oral bioavailability of oleanolic acid, a BCS Class IV compound, *Int. J. Pharm*. **404(1–2)** (2011) 148–158.
51. G. Zhao, J. Duan, Y. Xie, G. Lin, H. Luo, G. Li i X. Yuan, Effects of solid dispersion and self-emulsifying formulations on the solubility, dissolution, permeability and pharmacokinetics of isorhamnetin, quercetin and kaempferol in total flavones of Hippophae rhamnoides L, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **39(7)** (2013) 1037–1045.
52. A. S. Zidan, Z. Rahman, V. Sayeed, A. Raw, L. Yu i M. A. Khan, Crystallinity evaluation of tacrolimus solid dispersions by chemometric analysis. *Int. J. Pharm*. **423(2)** (2012) 341–350.
53. A. Paudel, Z. A. Worku, J. Meeus, S. Guns i G. Van Den Mooter, Manufacturing of solid dispersions of poorly water soluble drugs by spray drying: Formulation and process considerations, *Int. J. Pharm*. **453(1)** (2013) 253–284.
54. L. Yu, Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **48(1)** (2001) 27–42.
55. J. A. Baird i L. S. Taylor, Evaluation of amorphous solid dispersion properties using thermal analysis techniques. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64(5)** (2012) 396–421.
56. S. K.El-arini i H. Leuenberger, Dissolution properties of praziquantel – PVP systems,

Pharm. Acta Helv. **73(2)** (1998) 89–94.

57. S. K. El-arini i H. Leuenberger, Dissolution properties of praziquantel – PVP systems, (1998) 89–94.
58. N. Passerini, B. Albertini, B. Perissutti i L. Rodriguez, Evaluation of melt granulation and ultrasonic spray congealing as techniques to enhance the dissolution of praziquantel, *Int. J. Pharm*. **318(1–2)** (2006) 92–102.
59. Y. Liu, T. Wang, W. Ding, C. Dong, X. Wang, J. Chen i Y. Li, Dissolution and oral bioavailability enhancement of praziquantel by solid dispersions, *Drug Deliv. Transl. Res.* **8(3)** (2018) 580–590.
60. M. V. Chaud, P. Tamascia, A. C. de Lima, M. O. Paganelli, M. P. D. Gremião, M. P. D. i O. de Freitas, Solid dispersions with hydrogenated castor oil increase solubility, dissolution rate and intestinal absorption of praziquantel, *Brazilian J. Pharm. Sci.* **46(3)** (2010) 473–481.
61. L. Cheng, S. Guo i W. Wu, Characterization and in vitro release of praziquantel from poly(ε-caprolactone) implants, *Int. J. Pharm*. **377(1–2)** (2009) 112–119.
62. L. Cheng, L. Lei i S. Guo, In vitro and in vivo evaluation of praziquantel loaded implants based on PEG/PCL blends, *Int. J. Pharm*. **387(1–2)** (2010) 129–138.
63. A. L. R de Souza, T. Andreani, F. M. Nunes, D. L. Cassimiro, A. E. De Almeida, C. A. Ribeiro i E. B. Souto, Loading of praziquantel in the crystal lattice of solid lipid nanoparticles: Studies by DSC and SAXS, *J. Therm. Anal. Calorim.* **108(1)** (2012) 353–360.
64. R. M. Mainardes i R. C. Evangelista, PLGA nanoparticles containing praziquantel: Effect of formulation variables on size distribution, *Int. J. Pharm*. **290(1–2)** (2005) 137–144.
65. Y. Kawabata, K. Wada, M. Nakatani, S. Yamada i S. Onoue, Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications, *Int. J. Pharm*. **420(1)** (2011) 1–10.
66. J. Zhang i P. X. Ma, Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: Recent progress and future perspective, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65(9)** (2013) 1215–1233.
67. C. E. Wong, A. V. Dolzhenko, S. M. Lee i D. J. Young, Erratum: "Cyclodextrins: A Weapon in the Fight Against Antimicrobial Resistance", *J. Eng. Mater.* **05(04)** (2017).

68. M. E. Davis i M. E. Brewster, Cyclodextrin-based pharmaceutics: Past, present and future, *Nat. Rev. Drug Discov.* **3(12)** (2004) 1023–1035.
69. J. C. de Miranda, T. E. A. Martins, F. Veiga i H. G. Ferraz, Cyclodextrins and ternary complexes: Technology to improve solubility of poorly soluble drugs, *Brazilian J. Pharm. Sci.* **47(4)** (2011) 665–681.
70. T. Loftsson i M. E. Brewster, Pharmaceutical applications of cyclodextrins: Basic science and product development, *J. Pharm. Pharmacol.* **62(11)** (2010) 1607–1621.
71. D. Duchêne, Cyclodextrins and Their Inclusion Complexes, *Cyclodextrins in Pharmaceutics, Cosmetics, and Biomedicine: Current and Future Industrial Applications*, (2011) 1–18.
72. P. Saokham, C. Muankaew, P. Jansook i T. Loftsson, Solubility of cyclodextrins and drug/cyclodextrin complexes, *Molecules* **23(5)** (2018) 1–15.
73. P. Jansook, N. Ogawa i T. Loftsson, Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications, *Int. J. Pharm*. **535(1–2)** (2018) 272–284.
74. H. Marques, A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles, *Flavour. Frag. J.* **25(5)** (2010) 313–326.
75. J. Szejtli, Past, Present, and Future of Cyclodextrin Research, *Pure Appl. Chem.* **76(10)** (2004) 1825–1845.
76. T. Loftsson i M. E. Brewster, Cyclodextrins as Functional Excipients: Methods to Enhance Complexation Efficiency, *J. Pharm. Sci*. **101(9)** (2012) 3019–3032.
77. S. V. Kurkov i T. Loftsson, Cyclodextrins, *Int. J. Pharm*. **453(1)** (2013) 167–180.
78. P. Mura, Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **113** (2015) 226–238.
79. G. Becket, L. Schep i M. Tan, Improvement of the in vitro dissolution of praziquantel by complexation with α -, β - and γ -cyclodextrins, *Int. J. Pharm*. **179(1)** (1999) 65–71.
80. M. B. de Jesus, L. de M. A. Pinto, L. F. Fraceto, L. F. Takahata, Y. Lino, A. C. S. Jaime i E. de Paula, Theoretical and experimental study of a praziquantel and beta-cyclodextrin inclusion complex using molecular mechanic calculations and H1-nuclear magnetic resonance, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41(4)** (2006) 1428–1432.
81. M. B. de Jesus, L. de M. A. Pinto, L. F. Fraceto, L. F. L. A. Magalhães, E. M. Zanotti-Magalhães i E. de Paula, Improvement of the oral praziquantel anthelmintic effect by

cyclodextrin complexation Oral praziquantel anthelmintic effect by cyclodextrin complexation, *J. Drug Target.* **18(1)** (2010) 21–26.

82. L. C. da Silva Mourão, D. R. M. Ribeiro Batista, S. B. Honorato, A. P. Ayala, W. de Alencar Morais, E. G. Barbosa i T. F. A. de Lima e Moura, Effect of hydroxypropyl methylcellulose on beta cyclodextrin complexation of praziquantel in solution and in solid state, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **85(1–2)** (2016) 151–160.
83. S. Maragos, H. Archontaki, P. Macheras i G. Valsami, Effect of cyclodextrin complexation on the aqueous solubility and solubility/dose ratio of praziquantel, *AAPS PharmSciTech* **10(4)** (2009) 1444–1451.
84. S. G. Rodrigues, I. D. S. Chaves, N. F. S. De Melo, M. B. De Jesus, L. F. Fraceto, S. A. Fernandes i L. D. M. A. Pinto, Computational analysis and physico-chemical characterization of an inclusion compound between praziquantel and methyl-β-cyclodextrin for use as an alternative in the treatment of schistosomiasis, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **70(1–2)** (2011) 19–28.
85. M. Münster, A. H. A. Mohamed-Ahmed, L. I. Immohr, C. Schoch, C. Schmidt, C. Tuleu i J. Breitkreutz, Comparative in vitro and in vivo taste assessment of liquid praziquantel formulations, *Int. J. Pharm.* **529(1–2)** (2017) 310–318.
86. N. Qiao, M. Li, W. Schlindwein, N. Malek, A. Davies i G. Trappitt, Pharmaceutical cocrystals: An overview, *Int. J. Pharm.* **419(1–2)** (2011) 1–11.
87. S. L. Childs i K. I. Hardcastle, Cocrystals of piroxicam with carboxylic acids, *Cryst. Growth Des.* **7(7)** (2007) 1291–1304.
88. N. Schultheiss i A. Newman, Pharmaceutical cocrystals and their physicochemical properties, *Cryst. Growth Des.* **9(6)** (2009) 2950–2967.
89. Y. Yan, J.-M. Chen i T.-B. Lu, Simultaneously enhancing the solubility and permeability of acyclovir by crystal engineering approach, *Cryst. Eng. Comm.*, **15(33)** (2013) 6457.
90. A. Dalpiaz, B. Pavan i V. Ferretti, Can pharmaceutical co-crystals provide an opportunity to modify the biological properties of drugs?, *Drug Discov. Today* **22(8)** (2017) 1134–1138.
91. O. N. Kavanagh, D. M. Croker, G. M. Walker i M. J. Zaworotko, Pharmaceutical cocrystals: from serendipity to design to application, *Drug Discov. Today* **24(3)** (2019) 796–804.

92. T. Friščič i W. Jones, Recent advances in understanding the mechanism of cocrystal formation via grinding, *Cryst. Growth Des.* **9(3)** (2009) 1621–1637. https://doi.org/10.1021/cg800764n
93. J. C. Espinosa-Lara, D. Guzman-Villanueva, J. I. Arenas-García, D. Herrera-Ruiz, J. Rivera-Islas, P. Román-Bravo i H. Höpfl, Cocrystals of active pharmaceutical ingredients - Praziquantel in combination with oxalic, malonic, succinic, maleic, fumaric, glutaric, adipic, and pimelic acids, *Cryst. Growth Des.* **13(1)** (2013) 169–185.
94. D. Hasa, B. Perissutti, C. Cepek, S. Bhardwaj, E. Carlino, M. Grassi i D. Voinovich, Drug salt formation via mechanochemistry: The case study of vincamine, *Mol. Pharm.* **10(1)** (2013) 211–224.
95. I. Colombo, G. Grassi i M. Grassi, Drug Mechanochemical Activation, *J. Pharm. Sci*. **98(11)** (2009) 3961–3986.
96. S. L. James, C. J. Adams, C. Bolm, D. Braga, P. Coller, T. Friščić, F. Grepioni, K. D. Harris, G. Hyett, W. Jones, A. Krebs, J. Mack, L. Maini, A. G. Orpen, I. P. Parkin, W. C. Shearouse, J. W. Steed i D. C. Waddell, Mechanochemistry: opportunities for new and cleaner synthesis, *Chem. Soc. Rev.* **41 (1)** (2012) 412 – 447.
97. http://www.sun-way.com.tw/resourcefile/sunway_wab/brochure_ball_mills_en-New_MM.pdf) (preuzeto 6. studenog 2019.)
98. D. Doiphode, S. Gaikwad, Y. Pore, B. Kuchekar i S. Late, Effect of β-cyclodextrin complexation on physicochemical properties of zaleplon, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **62(1–2)** (2008) 43–50.
99. A. Hafner, J. Lovrić, D. Voinovich i J. Filipović-Grčić, Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: Physicochemical characterisation and permeability through Caco-2 cell monolayers, *Int. J. Pharm*. **381(2)** (2009) 205–213.
100. M. Barzegar-Jalali, M. Alaei-Beirami, Y. Javadzadeh, G. Mohammadi, A. Hamidi, S. Andalib i K. Adibkia, Comparison of physicochemical characteristics and drug release of diclofenac sodium-eudragit? RS100 nanoparticles and solid dispersions, *Powder Technol.* **219** (2012) 211–216.
101. S. K. el-Arini, D. Giron i H. Leuenberger, Solubility properties of racemic praziquantel and its enantiomers. *Pharm. Dev. Technol.* **3(4)** (1998) 557–564.

102. A. Gombas, P. Szabo-Revesz, M. Kata, G. Regdon i I. Eros, Quantitative Determination of Crystallinity of α-Lactose Monohydrate by DSC, *J. Therm. Anal. Calorim.* **68** (2002) 503–510.
103. B. Shah, V. K. Kakumanu i A. K. Bansal, Analytical techniques for quantification of amorphous/crystalline phases in pharmaceutical solids, *J. Pharm. Sci.* **95(8)** (2006)1641–1665.
104. R. Talukder, C. Reed, T. Dürig i M. Hussain, Dissolution and solid-state characterization of poorly water-soluble drugs in the presence of a hydrophilic carrier, *AAPS PharmSciTech* **12(4)** (2011) 1227–1233.
105. Y. He i C. Ho, Amorphous Solid Dispersions: Utilization and Challenges in Drug Discovery and Development, *J. Pharm. Sci.* **104(10)** 2015 3237–3258.
106. E. P. Lavor, M. V. M. Navarro, F. D. Freire, C. F. S. Aragão, F. N. Raffin, E. G. Barbosa i T. F. A. de Lima e Moura, Application of thermal analysis to the study of antituberculosis drugs–excipient compatibility, *J. Therm. Anal. Calorim.* **115(3)** (2014) 2303–2309.
107. H. Barańka, J. Kuduk-Jaworska, R. Szostak i A. Romaniewska, Vibrational spectra of racemic and enantiomeric malic acids, *J. Raman Spectrosc.* **34(1)** (2003) 68–76.
108. S. A. Brandán, L. C. Bichara, H. E. Lans, E. G. Ferrer i M. B. Gramajo, Vibrational study and force field of the citric acid dimer based on the SQM methodology, *Adv. Phys. Chem.*(2011)
109. R. Bhattacharjee, Y. S. Jain i H. D. Bist, Laser Raman and infrared spectra of tartaric acid crystals. *J. Raman Spectrosc.* **20(2)** (1989) 91–97.
110. M. Adachi, Y. Hinatsu, K. Kusamori, H. Katsumi, T. Sakane, M. Nakatani i A. Yamamoto, Improved dissolution and absorption of ketoconazole in the presence of organic acids as pH-modifiers, *Eur. J. Pharm. Sci.***76** (2015) 225–230.
111. L. Sreenivas Reddy, S. J. Bethune, J. W. Kampf i N. Rodríguez-Hornedo, Cocrystals and salts of gabapentin: pH dependent cocrystal stability and solubility, *Cryst. Growth Des.* **9(1)** (2009) 378–385.
112. E. M. M. Del Valle, Cyclodextrins and their uses: A review, *Process Biochem.* **39(9)** (2004) 1033–1046.
113. J. Jablan, I. Bačić, N. Kujundžić i M. Jug, Zaleplon co-ground complexes with natural and polymeric β-cyclodextrin, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.*

76(3–4) (2013) 353–362.

114. N. Mennini, M. Bragagni, F. Maestrelli i P. Mura, Physico-chemical characterization in solution and in the solid state of clonazepam complexes with native and chemically-modified cyclodextrins, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **89** (2014) 142–149.
115. M. Jug, N. Mennini, K. E. Kövér i P. Mura, Comparative analysis of binary and ternary cyclodextrin complexes with econazole nitrate in solution and in solid state, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **91** (2014) 81–91.
116. M. Pedersen, S. Bjerregaard, J. Jacobsen, A. Rômmelmayer Larsen i A. Mehlsen Sørensen, An econazole β-cyclodextrin inclusion complex: an unusual dissolution rate, supersaturation, and biological efficacy example, *Int. J. Pharm*. **165(1)** (1998) 57–68.
117. J. Siepmann i F. Siepmann, Mathematical modeling of drug dissolution, *Int. J. Pharm*. **453(1)** (2013) 12–24.
118. F. Maestrelli, M. Cirri, N. Mennini, N. Zerrouk i P. Mura, Improvement of oxaprozin solubility and permeability by the combined use of cyclodextrin, chitosan, and bile components, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **78(3)** (2011) 385–393.
119. P. Costa i J. M. Sousa Lobo, Modeling and comparison of dissolution profiles, *Eur. J. Pharm. Sci.***13(2)** (2001) 123–133.
120. A. Trapani, M. Garcia-Fuentes i M. J. Alonso, Novel drug nanocarriers combining hydrophilic cyclodextrins and chitosan, *Nanotechnology*, **19(18)** (2008) 185101.
121. R. Challa, A. Ahuja, J. Ali i R. K. Khar, Cyclodextrins in drug delivery: an updated review, *AAPS PharmSciTech* **6(2)** (2005) E329–E357.
122. L. R. de Souza, L. A. Muehlmann, M. S. C. Dos Santos, R. Ganassin, R. Simón-Vázquez, G. A. Joanitti i S. N. Báo, PVM/MA-shelled selol nanocapsules promote cell cycle arrest in A549 lung adenocarcinoma cells, *J. Nanobiotechnology*, **12** (2014) 32.
123. F. M. Mady, A. E. Abou-Taleb, K. A. Khaled, K. Yamasaki, D. Iohara, K. Taguchi i M. Otagiri, Evaluation of carboxymethyl-β-cyclodextrin with acid function: Improvement of chemical stability, oral bioavailability and bitter taste of famotidine, *Int. J. Pharm*. **397(1–2)** (2010) 1–8.
124. E. Pinho, M. Grootveld, G. Soares i M. Henriques, Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds, *Carbohydr. Polym.* **101(1)** (2014) 121–135.

125. F. L. A. Santos, L. A. Rolim, C. B. M. Figueirêdo, M. A. M. Lyra, M. S. Peixoto, L. R. M. Ferraz i P. J. R. Neto, A study of photostability and compatibility of the anti-chagas drug Benznidazole with pharmaceutics excipients, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **41(1)** (2015) 63–69.
126. M. Čizmić, D. Ljubas, L. Ćurković, I. Škorić i S. Babić, Kinetics and degradation pathways of photolytic and photocatalytic oxidation of the anthelmintic drug praziquantel, *J. Hazard. Mater.* **323** (2017) 500–512.
127. M. I. Suleiman, E. I. A. Karim, K. E. E. Ibrahim, B. M. Ahmed, A. E. M. Saeed i A. E. M. E. Hamid, Photo -Thermal Stability of Praziquantel. *Saudi Pharm. J.* **12(4)** (2004) 157–162.
128. G. R. Adelli, S. P. M. Balguri i S. Majumdar, Effect of Cyclodextrins on Morphology and Barrier Characteristics of Isolated Rabbit Corneas, *AAPS PharmSciTech* **16(5)** (2015) 1220–1226.
129. T. Kiss, F. Fenyvesi, I. Bácskay, J. Váradi, É. Fenyvesi, R. Iványi i M. Vecsernyés, Evaluation of the cytotoxicity of β-cyclodextrin derivatives: Evidence for the role of cholesterol extraction, *Eur. J. Pharm. Sci.* **40(4)** (2010) 376–380.
130. L. B. Salem, C. Bosquillon, L. A. Dailey, L. Delattre, G. P. Martin, B. Evrard i B. Forbes, Sparing methylation of β-cyclodextrin mitigates cytotoxicity and permeability induction in respiratory epithelial cell layers in vitro, *J. Control. Release* **136(2)** (2009) 110–116.
131. J. Weyermann, D. Lochmann i A. Zimmer, A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int. J. Pharm.* **288(2)** (2005) 369–376.
132. G. Da Violante, N. Zerrouk, I. Richard, G. Provot, J. C. Chaumeil, P. Arnaud i P. A. Rnaud, Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. *Biol. Pharm. Bull.* **25(12)** (2002) 1600–1603.
133. P. Artursson, K. Palm i K. Luthman, Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46(1–3)** (2001) 27–43.
134. R. B. van Breemen i Y. Li, Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **1(2)** (2005) 175–185.
135. M. Másson, T. Loftsson, G. Másson i I E. Stefánsson, Cyclodextrins as permeation enhancers: Some theoretical evaluations and in vitro testing, *J. Control. Release*

59(1) (1999) 107–118.

136. C. Muankaew i T. Loftsson, Cyclodextrin-Based Formulations: A Non-Invasive Platform for Targeted Drug Delivery, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **122(1)** (2018) 46–55.
137. N. K. Sachan, A. Bhattacharya, S. Pushkar i A. Mishra, Biopharmaceutical classification system: A strategic tool for oral drug delivery technology, *Asian J. Pharm.* **3(2)** (2014) 76–81.
138. D. a. Volpe, E. B. Asafu-Adjaye, C. D. Ellison, S. Doddapaneni, R. S. Uppoor i M. a. Khan, Effect of ethanol on opioid drug permeability through caco-2 cell monolayers, *AAPS J.* **10(2)** (2008) 360–362.
139. J. M. Kratz, M. R. Teixeira, K. Ferronato, H. F. Teixeira, L. S. Koester i C. M. O. Simões, Preparation, Characterization, and In Vitro Intestinal Permeability Evaluation of Thalidomide–Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin Complexes, *AAPS PharmSciTech* **13(1)** (2012) 118–124.
140. B. Srinivasan, A. R. Kolli, M. B. Esch, H. E. Abaci, M. L. Shuler i J. J. Hickman, TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems, *J. Lab. Autom.* **20(2)** (2015) 107–126.
141. S. Ferruzza, C. Rossi, Y. Sambuy i M. L. Scarino, Serum-reduced and serum-free media for differentiation of Caco-2 cells, *ALTEX* **30(2)** (2013) 159–168.

8. ŽIVOTOPIS

Martina Cugovčan rođena je 29. listopada 1984. godine u Koprivnici gdje je završila osnovnu i srednju školu. 2003. godine upisala je Prehrambeno – biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, te 2008. godine stječe diplomu diplomiranog inženjera biotehnologije. Diplomski rad izradila je u Belupu. d.d. u Koprivnici, kompaniji za proizvodnju i prodaju farmaceutskih pripravaka.

Sveučilišni poslijediplomski studij prirodnih znanosti, polje Kemija, smjer Analitička kemija na Prirodoslovno – matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2011. godine. Doktorsku disertaciju izrađuje pod vodstvom prof. dr. sc. Nives Galić i izv. prof. dr. sc. Maria Juga.

Od 2009. do 2013. godine zaposlena je kao Analitičar u kontroli kvalitete u Farmalu d.d. u Ludbregu, dok od 2013. pa do danas radi kao suradnik u registraciji lijekova u Generi d.d. u Rakovom Potoku gdje i odrađuje praktični dio ove doktorske disertacije.

Do sada je kao autor 2017. godine objavila jedan znanstveni rad u časopisu *Journal of pharmaceutical and biomedicalanalysis* pod nazivom “Biopharmaceutical characterization of praziquantel cocrystals and cyclodextrin complexes prepared by grinding“. Udana je i majka jednog djeteta.