Oslobađanje lijeka iz parenteralnih treapijskih sustava metodama in vitro i korelacija in vitro in vivo

Radić, Maja

Professional thesis / Završni specijalistički

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:800980

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Maja Radić

OSLOBAĐANJE LIJEKA IZ PARENTERALNIH TERAPIJSKIH SUSTAVA METODAMA *IN VITRO* I KORELACIJA *IN VITRO IN VIVO*

Specijalistički rad

Zagreb, 2017.

SAŽETAK

Cilj istraživanja

Cilj ovog specijalističkog rada jest sustavnim pregledom dostupne literature sistematizirati dosadašnje spoznaje u razvoju modela *in vitro-in vivo* korelacije (IVIVC) terapijskih sustava za parenteralnu primjenu s modificiranim oslobađanjem. U radu je dan osvrt na različite vrste parenteralnih pripravaka s modificiranim prvenstveno produljenim/kontroliranim oslobađanjem na tržištu, *in vitro* metode kojima se prati oslobađanje djelatne tvari iz takvih ljekovitih pripravaka, te parametre razvoja uspješnih *in vitro in vivo* korelacija koje se mogu koristiti kao zamjena za bioekvivalencijske studije.

Materijali i metode

Istraživanja u okviru specijalističkog rada su teorijskog karaktera. Pretraživanjem odgovarajuće stručne i znanstvene literature skupljeni su podaci o *in vitro* metodama koje se koriste za praćenje oslobađanja lijeka iz parenteralnih pripravaka s modificiranim oslobađanjem, te je dan osvrt na parametre razvoja uspješnih *in vitro in vivo* korelacija. Pregledno su prikazani literaturno dostupni parametri razvoja *in vitro* metoda oslobađanja djelatne tvari te uspješni IVIVC modeli kojima je razjašnjen mehanizam oslobađanja lijeka što predstavlja polazište za daljnja istraživanja.

Rezultati

Trenutno važeća europska i američka farmakopeja ne sadrže standardne *in vitro* metode za oslobađanje iz parenteralnih pripravaka s modificiranim oslobađanjem. *In vitro* metode oslobađanja za takve ljekovite pripravke općenito se mogu podijeliti na metode uzorkovanja i odjeljivanja, metode kontinuiranog protoka i metode dijalize. Razvoj *in vitro* metoda oslobađanja uključuje odabir aparature, sastava medija, protoka, temperature, vremena uzorkovanja i trajanja testa, količine oslobođene supstancije… Stručna i znanstvena literatura ukazuje na potrebu razvoja odgovarajućeg modela kojim će se korelirati *in vitro* oslobađanje lijeka *s in vivo* oslobađanjem i apsorpcijom. Sa stajališta formulacijskog razvoja i kontrole kvalitete, uspješan *in vitro* model praćenja oslobađanja ljekovite supstancije treba razlikovati formulacije koje pokazuju sličan mehanizam oslobađanja lijeka, kao i razlike u procesu i/ili mjestu proizvodnje. Razvoj modela *in vitro in vivo* korelacije (IVIVC) je složen, ne samo zbog kompleksnosti parenteralnih sustava za dostavu lijeka (primjerice oslobađanja lijeka u više faza), već i zbog nedostatka odgovarajućih *in vitro* metoda. U proteklih dvadesetak godina najviše su se razvijali korelacijski modeli za polimerne mikrosferne/implantne sustave, dok se većina dostupne literature svodi na razvojne tzv. *proof of concept* studije koje samo nagovještaju mogućnost korelacije.

Zaključak

Razvoj parenteralnih terapijskih sustava za produljeno/kontrolirano oslobađanje ljekovitih supstancija treba predstavljati međusobnu ovisnost *in vivo* i *in vitro* karakteristika gotovog proizvoda. Paralelno s razvojem novih i složenijih sustava za dostavu lijeka, treba razmišljati o važnosti pouzdane *in vitro* metode koja pomaže u ostvarenju krajnjeg cilja, a to je osiguravanje kliničkog djelovanja, sigurnost i učinkovitost parenteralnog pripravka.

Objectives

The objective of this research is to provide a systematic overview of literature concerning the development of *in vitro in vivo* correlations for long-acting parenteral drug delivery systems. Different types of long-acting parenteral formulations, *in vitro* release testing methods, and parameters of a successful *in vitro in vivo* correlation development process, used as a substitute for bioequivalence studies, are briefly described.

Materials and methods

Recent scientific literature was examined, with an emphasis on available data regarding various *in vitro* release testing methods as well as successfully developed IVIVC models that show an understanding of the release characteristics of long-acting parenteral drug delivery systems over time.

Results

Currently, no standard *in vitro* release methods for long-acting parenteral drug delivery systems are described in European or U.S. Pharmacopoeia. *In vitro* release methods can be categorized into three groups: sample and separate, flow-through and dialysis methods. As these drug delivery systems have different characteristics, along with varying sites and modes of administration, it is essential that apparatus selection, composition of the release medium, agitation (flow rate), temperature, sampling time and test duration, and the amount of drug released are appropriately considered during *in vitro* release method development. In the published literature authors agree that robust models to correlate *in vitro* and *in vivo* drug performance need to be developed. A successful *in vitro* release model

can be used as a quality control and formulation development tool to support changes in formulation, process, and manufacturing site. However, the development of *in vitro* release methods that reliably predict *in vivo* performance is challenging, not only because of the complexity of the products (e.g. the drug is released in multiple phases), but also due to a lack of appropriate *in vitro* methods. During the last twenty years IVIVC correlation models have mostly been developed for polymeric microsphere/implant systems, and most of the literature available relates to *proof of concept* studies.

Conclusion

The development of long-acting parenteral drug delivery systems should be based on the relationship between *in vivo* and *in vitro* characteristics of the drug delivery system. The development of new and more complex drug delivery systems requires reliable *in vitro* methods, which are an important factor in achieving the ultimate goal: excellent clinical activity, safety, and efficacy of the parenteral drug delivery system.

Sadržaj

1. Uvod i pregled područja istraživanja 8
2. Cilj istraživanja 11
3. Materijali i metode 12
3.1. Parenteralni pripravci s modificiranim oslobađanjem 12
3.2. Podjela parenteralnih pripravaka s modificiranim oslobađanjem 17
3.3. *In vitro* metode oslobađanja ljekovite supstancije iz parenteralnih terapijskih sustava s modificiranim oslobađanjem 24
3.4. Parametri razvoja *in vitro* metode za praćenje oslobađanja lijeka iz parenteralnog pripravka s modificiranim oslobađanjem 26
3.4.1. Receptorski medij 27
3.4.2. Uvjeti osigurane topljivosti u receptorskom mediju 27
3.4.3. Robusnost *in vitro* metode oslobađanja lijeka iz parenteralnih sustava s modificiranim oslobađanjem 29
3.4.4. Naglo početno oslobađanje (eng. *burst release*) 29
3.4.5. Stabilnost lijeka 30
3.4.6. Opseg *in vitro* oslobađanja 31
3.4.7. Važnost *in vitro* metode u fiziološkim *in vivo* uvjetima 31
3.4.8. Metode ubrzanog oslobađanja 32
3.5. Podjela tehnika *in vitro* oslobađanja 33
3.5.1. Uzorkovanje i odjeljivanje (*eng. sample and separate*) 33
3.5.2. Tehnika kontinuiranog protoka *(eng. continuous flow)* 35
3.5.3 Tehnika dijalize 39
3.5.4. Standardne farmakopejske metode 41
3.6. Usporedba *in vitro* profila oslobađanja 44
3.7. Korelacije *in vivo in vitro* (IVIVC) 45
3.8. Oslobađanje lijeka *in vivo* nakon primjene 47
3.9. Tipovi korelacije 48
3.10. Korištenje korelacije *in vitro in vivo* za potrebe razvoja polimernih mikrosustava s produljenim oslobađanjem 50
3.11. Metodologija *in vitro* oslobađanja 52
3.12. Evaluacija *in vivo* podataka iz studija 52

3.13. Matematički modeli za IVIVC 53
3.14. Primjeri IVIVC za parenteralne mikrosferne sustave 55
3.15.IVIVC i parenteralne uljne (lipofilne) otopine 61
3.16. IVIVC i parenteralne suspenzije 63
3.17. IVIVC i parenteralni depo sustavi (*in situ* formirajući depo sustavi) 64
3.18. Europski regulatorni zahtjevi za farmakokinetsku i kliničku evaluaciju terapijskih sustava s modificiranim oslobađanjem 65
3.19. Američki regulatorni zahtjevi za farmakokinetsku i kliničku evaluaciju terapijskih sustava s modificiranim oslobađanjem 67
4. Rasprava 69
5. Zaključak 75
6. Literatura 76
7. Životopis 79

1. Uvod i pregled područja istraživanja

Konstantna koncentracija lijeka na mjestu djelovanja kroz dulje vrijeme pospješuje terapijsku učinkovitost i smanjuje nuspojave. Terapijski sustavi za modificirano, promijenjeno oslobađanje kod kojih je brzina i mjesto oslobađanja različito od oblika trenutnog oslobađanja dijele se na sustave za produljeno, odgođeno ili pak višefazno oslobađanje aktivnih farmaceutskih supstancija (API), intramuskularne/subkutane depo formulacije te transdermalne terapijske sustave za dostavu lijeka (1). Sustavi za modificirano oslobađanje intenzivnije se razvijaju posljednjih godina, te se godišnje otprilike osamdesetak novih proizvoda odobri od strane regulatornih agencija (2). Kada se govori o terapijskim sustavima s produljenim/kontroliranim oslobađanjem, riječ je prvenstveno o složenim parenteralnim (gr. para =“mimo" and enteron = “crijeva“) pripravcima koji se primjenjuju sistemski. Lijek se parenteralno, zaobilazeći probavni trakt, najčešće unosi u organizam injektiranjem u venu (intravenski), u mišić (intramuskularno), pod kožu (intradermalno i subkutano). Ukratko, logika koja prati parenteralnu primjenu vezana je za povećanje učinkovitosti nisko permeabilnih ljekovitih supstancija te supstancija nestabilnih u gastrointestinalnom traktu. Parenteralna primjena koristi se za lijekove s niskom oralnom bioraspoloživošću. Prednosti pred oralnim načinom primjene lijeka uključuju:

- zaobilaženje metabolizma lijeka pri apsorpciji i prvom prolasku kroz jetra,
- sprječavanje mikrobiološke i/ili kemijske razgradnje lijeka,
- izbjegavanje učinka hrane i primjenjivih fizioloških uvjeta.

Brojne su metode primjene lijeka koje zaobilaze probavni trakt. Uključuju unos lijeka lokalno injektiranjem, infuzijom ili implantiranjem u terapijskim koncentracijama, te tako smanjuju neželjene nuspojave. Svrha kontroliranog i produljenog/odgođenog oslobađanja lijeka je povećanje aktivnosti lijeka, sigurna primjena, te kontrola razine lijeka u plazmi uz smanjenje

učestalosti doziranja što je olakšanje za bolesnika. Način primjene igra važnu ulogu u učinkovitosti lijeka, te je iznimno važno ne prijeći optimalan raspon terapijskih koncentracija kako bi se izbjegle toksične ili pak terapijski neučinkovite koncentracije (3). Prvi parenteralni terapijski sustav načinio je sredinom devetnaestog stoljeća Alexander Wood. Od tog su vremena brojna tehnološka dostignuća dovela do razvoja složenih sustava koji se koriste za kontrolirano produljeno/odgođeno oslobađanje parenteralnih ljekovitih pripravaka.

Kada je riječ o *in vitro* metodama koje opisuju mehanizam oslobađanja i djelovanja ljekovitih supstancija iz parenteralnih terapijskih sustava s modificiranim oslobađanjem, govorimo o razvoju odgovarajućih modela kojima će se korelirati *in vitro* s *in vivo* mehanizmima oslobađanja. *In vitro* eksperimentalne metode praćenja oslobađanja lijeka trebaju se razvijati imajući na umu *in vivo* profil i mehanizme oslobađanja. Za razliku od oralnih i transdermalnih ljekovitih prepravaka, trenutno važeća regulativa, europska i američka farmakopeja (EP i USP) ne sadrži standardne metode za parenteralne pripravke s modificiranim slobađanjem (4). Metode koje se koriste za praćenje oslobađanja lijeka iz parenteralnih pripravaka s modificiranim oslobađanjem mogu se podijeliti u slijedeće kategorije: klasične farmakopejske metode (USP aparatura 1, 2), metode uzorkovanja i odjeljivanja eng. *sample and separate* (S-S), metode kontinuiranog protoka eng. *continuous flow* za koje se koristi USP aparatura 4, te metode dijalize. Općenito je razvoj korelacije *in vitro-in vivo* (*eng. in vitro in vivo correlation,* IVIVC) za parenteralne pripravke složeniji u odnosu na IVIVC za oralne dozirne oblike. Samo je nekoliko uspješno razvijenih i validiranih modela za parenteralne pripravke. U proteklih dvadesetak godina najviše su se razvijali korelacijski modeli za polimerne mikrosferne/implantne sustave, dok za uljne depo formulacije nema literaturno dostupne korelacije na humanom modelu (5). Razvoj IVIVC modela je složen proces, ne samo zbog kompleksnosti formulacija (primjerice oslobađanje lijeka u više faza), već i zbog nedostatka odgovarajućih *in vitro* metoda. Većina dostupne

literature svodi se na razvojne tzv. *proof of concept* studije koje samo nagovještaju mogućnost korelacije. U razvoju *in vitro* metoda potrebno se, što je moguće više, približiti *in vivo* oslobađanju i apsorpciji lijeka. Primjerice, prilikom razvoja metoda za oslobađanje iz polimernih sustava mikrosfere/implanti treba voditi računa o primjeni pod kožu, u mišić ili direktno u zglob. Nakon injektiranja/implantiranja ljekovita se supstancija polagano oslobađa složenim procesima difuzije, erozije, nakon čega prelazi u sistemsku cirkulaciju (6). Validirani korelacijski model, korelacija A razine *(*eng. *level A),* se koristi za postavljanje specifikacijskih granica za praćenje brzine oslobađanja lijeka (eng. *dissolution*), i kao surogat za *in vivo* bioekvivalencijske studije. Važan je pravilan odabir *in vitro* metode praćenja oslobađanja lijeka, kao i razumijevanje kako variranje parametara metode utječe na mehanizam oslobađanja. Cilj je da razvijena metoda bude biorelevantna i korelira s rezultatima dobivenim u *in vivo* studijama kako bi se mogla koristiti kao zamjena za studije bioekvivalencije.

2. Cilj istraživanja

Cilj specijalističkog rada je sustavnim pregledom dostupne literature sistematizirati i povezati parenteralne terapijske sustave s modificiranim oslobađanjem i *in vitro* metodologiju praćenja oslobađanja ljekovite supstancije iz takvih sustava, te se osvrnuti na uspješnost razvoja korelacijskih modela i regulatorne zahtjeve. Predloženim specijalističkim radom se istražilo što je sve nužno razmatrati prilikom razvoja *in vitro* metoda oslobađanja lijeka iz parenteralng terapijskog sustava s modificiranim oslobađanjem, te hipoteza kako uspješno razvijeni *in vitro* modeli koreliraju s *in vivo* oslobađanjem i apsorpcijom lijeka.

Relevantni članci proučavni se analitički i kritički te su izdvojeni najvažniji rezultati, rasprave i zaključci koji su prikazani u radu. Na temelju literaturnih podataka izvedena su vlastita razmatranja proučavane problematike.

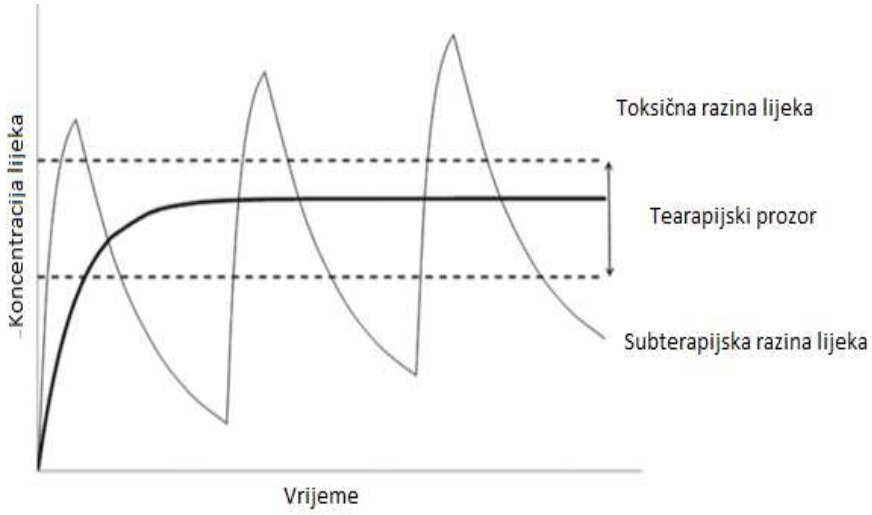
3. Materijali i metode

3.1. Parenteralni pripravci s modificiranim oslobađanjem

Kada je riječ o terapijskim sustavima s modificiranim, promijenjenim oslobađanjem, riječ je prvenstveno o složenim parenteralnim (gr. para =“mimo" and enteron = “crijeva“) pripravcima koji se promjenjuju sistemski. Svrha produljenog/kontroliranog oslobađanja lijeka je:

- povećanje aktivnosti lijekova,
- sigurnost primjene,
- postizanje kontroliranih razina lijeka u plazmi
- rjeđe doziranje što je lakše i ugodnije za pacijente.

Glavna prednost parenteralnih pripravaka s produljenim/kontroliranim oslobađanjem je postizanje terapijske aktivnosti kroz dulji vremenski period pri jednokratnoj primjeni. Višestruka oralna ili parenteralna primjena lijeka rezultira klasičnim “*peak and valley*” obrascem (Slika 1.). Vršna koncentracija lijeka (Cmax) može prijeći toksične razine lijeka i dovesti do neželjenih posljedica ili pak pasti ispod razine terapijske učinkovitosti (Cmin).



Slika 1. Shematski prikaz krivulje koncentracije lijeka u plazmi nakon višestruke primjene iz konvencionalnog dozirnog oblika (tanka linija tzv. eng. „*peak and valey*“) i pripravka s produljenim oslobađanjem (puna linija) (prilagođeno prema (3)).

Prednost uzimanja lijekova u obliku parenteralnih pripravaka s modificiranim oslobađanjem rezultira jednolikom koncentracijom (unutar granica terapijske učinkovitosti i toksičnih koncentracija) te, za neke lijekove, poboljšanom farmakodinamikom bez neželjenih nuspojava (npr. kod protutumorskih lijekova koji se koriste u kemoterapijama) (7).

Razvoj parenteralnih sustava ide usporedno s razvojem farmaceutske kemije, biotehnologije, polimerne tehnologije, te je važno poznavanje fizikalno kemijskih svojstava ljekovite i pomoćnih supstancija, farmakokinetike i farmakodinamike.

U slijedećim rečenicama ukratko su pobrojani terapijski sustavi koji se koriste za parenteralnu primjenu uz produljeno oslobađanje.

Jedni od prvih razvijenih pripravaka s produljenim oslobađanjem su prešane tablete steroida kod kojih je postepeno oslobađanje protuupalog lijeka iz tablete osigurano formulacijom. Značajan napredak dogodio se razvojem tehnologije biokompatibilnih razgradivih polimera (8). Biorazgradivi kopolimeri mliječne i glikolne kiseline (*eng. polylactic polyglycolyc acid PLGA*) koriste se za izradu sustava za produljeno djelovanje uz ljekovite supstancije kao što

su male molekule, peptidi, proteini, vakcine i druge biomolekule. Brzina razgradnje ovih kopolimera modificira se variranjem omjera mliječne i glikolne kiseline. Razvoj mikrosfera, sferičnih tvorevina suspendiranih u vodenom nosaču, baziranih na PLGA jedan je od najvećih uspjeha na području pripravaka s produljenim djelovanjem (3). U Tablici 1. prikazani su neki od komercijalno dostupnih parenteralnih pripravaka s produljenim/odgođenim oslobađanjem.

Tablica 1. Komercijalno dostupni parenteralni pripravci s modificiranim oslobađanjem.

Lijek	Naziv proizvoda	Primjena	Interval doziranja	Indikacija	Proizvođač
Uljne injekcije					
Haloperidol decanoate	Haldol Decanoate®	IM	jednom jesečno	shizofrenija	Ortho-McNeill Pharm
Fluperthixol decanoate	Fluanoxol Depot®	IM	2-4 tjedna	shizofrenija	Lundbeck
Fluphenazine decanoate	Fluphenazine Decanoate®	IM	2-4 tjedna	shizofrenija	App Pharm
Fluphenazine decanoate	Modecate®	IM	2-5 tjedna	shizofrenija	Sanofi-Aventis
Pipothalazine palmitate	Piportil Depot®	IM	Svaka 4 tjedna	shizofrenija	Sanofi-Aventis
Testosterone enanthate	Delatestryl®	IM	2-4 tjedna	hormonska terapija	Endo Pharma
Estradiol valerate	Delatestrogen®	IM	Svaka 4 tjedna	hormonska terapija	Monarch Pharm
Testosterone cypionate	Depo-Testosterone®	IM	2-4 tjedna	hormonska terapija	Pfizer
Estradiol cypionate	Depo-Estradiol®	IM	3-4 tjedna	hormonska terapija	Pfizer
Parenteralne suspenzije					
Olanzapine	Zyprexa Relprevv®	IM	2-4 tjedna	shizofrenija	Eli Lilly
Medroxyprogesterone acetate	Depo-Provera®	IM	svaka 3 mjeseca	hormonska terapija	Pfizer
Medroxyprogesterone acetate	Depo-Subq Provera 104®	SC	svaka 3 mjeseca	hormonska terapija	Pfizer
Aripiprazole	Abilify Maintena®	IM	jednom mjesečno	shizofrenija	Otsuka
Paliperidone Palmitate	Invega Sustenna®	IM	jednom mjesečno	shizofrenija	Janssen
Paliperidone Palmitate	Invega Trinza	IM	svaka 3 mjeseca	shizofrenija	Janssen

Prezasićene otopine					
Lanreotide acetate	Somatuline depot®	SC	jednom mjesečno	akromegalija	Tercica
Mikrosfere					
Risperidone	Risperdal consta®	IM	Svaka 2 tjedna	shizofrenija	Janssen
Naltrexone	Vivitrol®	IM	Jednom mjesečno	alkoholna ovisnost	Alkermes
Somatropin (rDNA origin)	Nutropin Depot®	SC	2-4 tjedna	hormonska terapija	Genetech
Leuprolide acetate	Luporn Depot®	IM	1-3 mjeseca	uznapredovali rak prostate	Abbott
Octreotide acetate	Sandostatin LAR Depot®	IM	svaka 4 tjedna	akromegalija	Novartis
Lanreotide acetate	Somatuline LA®	IM	svaka dva tjedna	akromegalija	Ipsen
***In situ* formirajući implanti**					
Leuprolide acetate	Eligard®	SC	svakih 1-6 mjeseci	uznapredovali rak prostate	Sanofi-Aventis

Razvijaju se i *in situ* formirajući gelovi koji formiraju viskozne strukture na mjestu injektiranja tzv. depo, te liposomi, sustavi u kojima se lijek nalazi u unutrašnjosti liposoma ili u lamelarnom sloju (7). Ostali parenteralni terapijski sustavi s produljenim oslobađanjem uključuju otopine, suspenzije, emulzije, nanosuspenzije i nanonosače modificirane na površini. Tehnološki razvoj doveo je i do komercijalnog razvoja PEG-iliranih sustava za parenteralnu primjenu bioloških molekula; peptida i proteina (3).

Pomoćne supstancije ili ekscipijensi su sastojci koji se dodaju djelatnoj tvari da bi se omogućila formulacija željenog terapijskog sustava. Uvriježeno je mišljenje da su to neaktivne kemijske supstancije koje ne pokazuju nikakvu farmakodinamsku aktivnost. Međutim, na temelju stečenog iskustva pokazalo se da pomoćne tvari mogu izazvati određene toksične učinke, biti uzrokom brojnih alergijskih reakcija, kao i izazvati različite interakcije, kako međusobno, tako i s aktivnom tvari lijeka. Stoga se odabiru pomoćnih tvari posvećuje

posebna pozornost. Nove tehnologije za parenteralne sustave s modificiranim oslobađanjem koriste pomoćne supstancije koje poboljšavaju dostavu lijeka (primjerice bolja apsorpcija ili kontrola brzine oslobađanja ljekovite supstancije). Takvo oslobađanje obično zahtjeva formiranje matriksnog sustava uz primjenu raznih polimera i odgađanje cjelokupnog trenutnog oslobađanja. Karakteristike pomoćnih tvari navedene u farmakopeji, su često nedostatne za opis funkcionalnih karakteristika pomoćne tvari u gotovom lijeku. Prema Zakonu o lijekovima razlikujemo poznate pomoćne tvari koje se upotrebljavaju u odobrenim lijekovima, i nove pomoćne tvari za koje ne postoje standardi kvalitete, te je potrebno okarakterizirati i utvrditi sigurnost primjene. Pomoćne supstancije koje se koriste za generičke lijekove trebaju odgovarati pomoćnim supstancijama u referentnom proizvodu.

Općenito za parenteralnu primjenu vrijedi da terapijski sustavi moraju zadovoljavati osnovne postulate među kojima su:

- Sterilnost

Sterilizacija se može postići procesima terminalne sterilizacije kao i aseptičkim procesom proizvodnje.

- Ujednačena koncentracija

Jedna od najvažnijih prednosti parenetralnih pripravaka s modificiranim oslobađanjem je relativno ujednačena koncentracija lijeka na mjestu djelovanja. Za opisivanje fiziološkog mehanizma oslobađanja lijeka koriste se *in vitro* metode koje koreliraju s *in vivo* sustavom.

- Učinkovita i sigurna primjena

Učinkovitost, djelotvornost i sigurnost primjene parenteralnih terapijskih sustava s modificiranim oslobađanjem dokazuje se u kontroliranim bioekvivalencijskim i kliničkim studijama. Kako bi se osigurala konzistentna učinkovitost i djelovanje unutar roka

valjanosti proizvodnih serija, moraju se osigurati specifikacijske granice. Specifikacija predstavlja popis svih zahtjeva kakvoće/ispitivanja s pozivom na korištene analitičke postupke te odgovarajuće granice prihvatljivosti, kojima djelatna tvar mora odgovarati kako bi mogla biti korištena za namijenjenu svrhu odnosno proizvodnju lijeka. Ispitivanja uključena u specifikaciju uključuju opća kao što su izgled, identifikacija, sadržaj i onečišćenja, primjenjiva na sve djelatne tvari, te specifična ispitivanja poput veličine čestica, fizikalno-kemijskih svojstava, polimorfizma i sl., koja se odabiru ovisno o svojstvima djelatne tvari i njenoj namjeni.

3.2. Podjela parenteralnih pripravaka s modificiranim oslobađanjem

Mogu se podijeliti na

- Disperzije kruto/tekuće
- Disperzije tekuće/tekuće
- Čvrste oblike – implanti

Prema promjeru unutarnje faze disperzije dijelimo na

- Makročestice > 100 μm
- Mikročestice 1-100 μm
- Nanočestice < 1 μm

Važno je naglasiti da je promjer unutarnje faze disperzije ograničen mogućnošću prolaza kroz hipodermičku iglu najčešće za intramuskularnu i subkutanu primjenu. Za izradu terapijskih sustava s modificiranim oslobađanjem koriste se

- viskozne makromolekule topljive u vodi (želatina, PVP),
- ulja kao otapala uz dodatak Al-monostearata, -distearata, -tristearata,
- formiranje tiksotropnih suspenzija

- formiranje netopljivih derivata lijeka (soli, kompleksi, esteri)
- kapsuliranje čestica (mikrokapsula, liposomi)

Dodatak makromolekula u sustav znači dodatak hidrofilnih koloida u vodeni sustav te vezanje u kompleks makromolekule i lijeka što utječe na povećanje viskoznosti, a time i na produljeno oslobađanje. Korištenjem ulja (kikirikijevo, sezamovo, ricinusovo) kao otapala mijenja se koeficijent raspodjele ulje/voda. Tiksotropni sustavi (grčki thixo = dotaći te tropos = obrat) znače promjenu reoloških osobina mehaničkim podražajem, te vraćanje u prvotno stanje kada poticaj prestaje. Sustavi se, u uvjetima skladištenja, stabiliziraju strukturom i viskoznošću. Mehaničkim podražajem (kod primjene) mijenja se viskoznost, tekuća faza prolazi kroz injekcijsku iglu te se na mjestu primjene (najčešće mišić), stvara kompaktni depo. Formiranjem kompleksa ili soli niže topljivosti, ili formiranjem makro kristala može se utjecati na brzinu oslobađanja te produljenje apsorpcije i bioraspoloživosti. Kod apsorpcijskog tipa, molekule lijeka vezane su za nosač, te je samo nevezana tj. slobodna frakcija dostupna za apsorpciju. Uklapanje lijeka u obliku krutine odvija se unutar permeabilne barijere ili se čestice lijeka dispergiraju u difuzijskom matriksu. Esterifikacijski tip depo formulacija nastaje esterifikacijom i pretvorbom u prolijek koji se enzimatskim procesima na mjestu djelovanja prevodi u aktivan lijeka. Također se u svrhu produljenog oslobađanja može koristiti razvoj sintetičkih i prirodnih polimera koji se *in vivo* razgrađuju enzimatski ili neenzimatski i time stvaraju biokompatibilne netoksične produkte koji se metaboliziraju ili izlučuju fiziološkim putem. Obzirom da je riječ o biorazgradivim polimerima nije potrebno kirurško uklanjanje istih, dok je oslobađanje kontrolirano mehanizmima difuzije. Prirodni polimeri koji se koriste jesu albumin, dekstran, želatina, hemoglobin, kitozan dok su sintetski polimeri polimliječna, poliglikolna kiselina. Često se primjenjuju kopolimeri mliječne i glikolne kiseline, zatim polikaprolakton, polianhidridi, poliortoesteri. Biorazgradivi polimerni sustavi koji sadrže polimere PLA, PLGA, želatinu i albumin koriste se kao nosači mikosfernih formulacija malih

molekula i biološki aktivnih molekula peptida i proteina. Polimeri PLA i PLGA odobreni su od strane američke regulative kao nosači implanta i sustavi za donošenje lijeka na mjesto djelovanja u organizmu. Mehanizmima razgradnje polimera, koji uključuju eroziju (bubrenje polimernih lanaca) te hidrolizu kovalentnih veza lanaca sve do razgradnje u topljive polimere, utječe se i na produljeno vrijeme oslobađanja lijeka. Mikrosfere su matriks sustavi u kojima je lijek otopljen ili dispergiran u polimeru. Zavisno o veličini čestica razlikuju se mikro i nano sfere. Mikrosfere mogu imati kontinuirani polimerni matriks unutar kojeg su molekule lijeka homogeno dispergirane ili smještene unutar ovojnice.

U parenteralne sustave s modificiranim oslobađanjem ubrajaju se i mikročestice i nanočestice koje se dobivaju mikronizacijom, promjenom faza (precipitacija lijeka – gelatina topljiva u vodi netopljiva u etanolu), emulgiranjem (veličina čestica unutarnje faze do 500 nm, izbor emulgatora ograničen je kompatibilnošću), te sušenje raspršivanjem otopina polimera. Liposomi su sferične tvorevine orijentiranih fosfolipidnih molekula (fosfatidilkolin, lecitin) veličine 25nm do 1000 nm. Molekule liposoma orijentiraju se u dvoslojne strukture i stvaraju ovojnicu što predstavlja sličnost s biološkim membranama. Liposomi su nosači lijekova prikladni za parenteralnu primjenu jer se hidrofilni i lipofilni lijekovi smještaju u vodenoj fazi ili nepolarnom dijelu ovojnice bez kemijskog vezanja. Depo sustavi su formulacije kontrolirane produljenim oslobađanjem djelatne tvari u vremenu, te formulacije kontrolirane apsorpcijom, enkapsulacijom, esterifikacijom. Samo nevezana, slobodna frakcija lijeka može se apsorbirati npr. vakcine u kojima su antigeni. Oslobađanje lijeka iz parenteralnih depo formulacija dešava se procesima difuzije, erozije, cijepanjem kovalentnih veza. Najčešće se parenteralni depo sustavi primjenjuju: subkutano, intramuskularno, intraartikularno i intravenski. Subkutana primjena koristi se većinom za dobro topljive lijekove koji se apsorbiraju uz ograničen volumen injektiranja (0.5 do 1.5 mL). Primjena u mišić pogodna je za polimerne sustave ili loše topljive lijekove uz volumen injektiranja do 2 mL. Intravenski

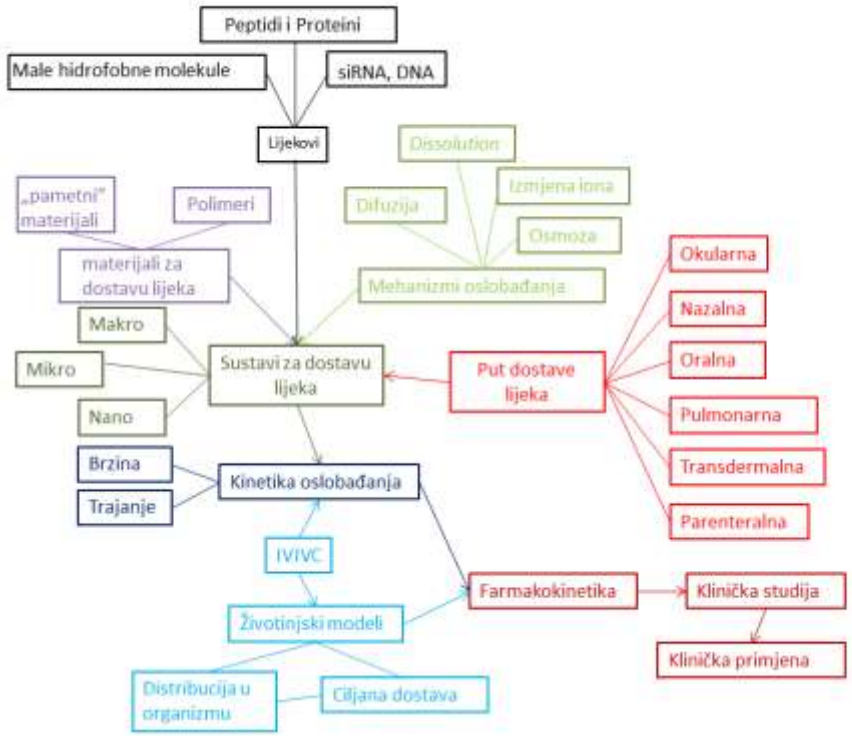
put koristi se za liposome, nanočestice, mikrosfere. Intraperitonealna primjena učinkovita je za ulazak antineoplastika u limfu. U većini slučajeva lijek djeluje lokalno na mjestu injektiranja npr. parenteralna depo formulacija suspenzije kortikosteroida u zglob. Isto tako injektirani lijek može se sistemskom cirkulacijom prenijeti do mjesta djelovanja (npr. antipsihotici ili terapeutici za hormonsku zamjenu). Za vodene i uljne otopine vrijedi da se na oslobađanje može utjecati povećanjem viskoznosti nosača. Uljne otopine koriste se za lipofilne lijekove. Suspenzije s veličinama čestica iznad 0,1 mm koriste se za subkutanu, intramuskularnu, ili intraartikularnu primjenu. Mikro i nanoemulzije koriste se za solubiliziranje lipofilnih i hidrofobnih molekula, kao i onih koje su podložne hidrolizi. Emulzije su tekuće disperzije koje mogu biti ulje u vodi, voda u ulju ili višestruke emulzije. Nanoemulzije su homogene, transparentne i termodinamski stabilne formulacije veličine kapljica u rasponu od 10 – 100 nm. Termodinamičku stabilnost emulzija povećavaju emulgirajući i viskozni agensi. Tehnološki postupak dobivanja emulzija može utjecati na veličinu kapljica te na stabilnost sustava. Nanosuspenzije su čestice promjera manjeg od 1 nm koje se koriste za poboljšanje bioraspoloživosti molekula koje imaju nisku topljivost u vodi. Za izradu nanočestica u laboratorijskom, uvećanom i proizvodnom mjerilu, koriste se tehnologije koje su pogodne za većinu ljekovitih supstancija. Obzirom da su nanočestice često podložne brzom izlasku iz organizma, nestabilne u fiziološkim uvjetima, te podložne apsorpciji od strane mononuklearnog fagocitnog sustava, koriste se modifikacije površine nanosustava koje pospješuju produljeno zadržavanje u organizmu. Za stabilizaciju submikronskih koloidnih disperzija čestica lijeka koriste se površinski aktivne tvari. Općenito se ljekoviti pripravci mogu se podijeliti u pripravke prve, druge i treće generacije. Dok se u prošlosti kod razvoja pripravaka prve generacije odvojeno promatrala sama aktivna supstancija od sustava za dostavu lijeka, u sadašnjosti i budućnosti (druga i treća generacija) stavlja se naglasak na integrirani razvoj aktivnih supstancija u sklopu terapijskog sustava. U

razdoblju od pedesetih do sedamdesetih godina prošlog stoljeća, kada je pripremljena prva formulacija s kontroliranim oslobađanjem lijeka, stekla su se osnovna znanja o kontroliranoj dostavi lijeka te što su različiti mehanizmi oslobađanja (brzina otapanja, difuzija, osmoza, izmjena iona). Početak istraživanja druge generacije vezan je uz mehanizme oslobađanja i kinetiku nultog reda koja osigurava konstantnu koncentraciju lijeka u krvi. Drugu generaciju obilježava i razvoj tehnologija za dostavu lijeka na mjesto djelovanja:tzv. pametni polimeri, hidrogelovi, biorazgradivi mikročestični sustavi i oslobađanje koje je vezano za fiziološke faktore (pH, temperatura, razina glukoze…). Posljednja dekada druge generacije obilježena je nanotehnologijom. U drugu generaciju parenteralnih sustava za dostavu lijeka koji nastaju modificiranjem sustava prve generacije ubrajamo nanočestice koje se koriste za ciljano donošenje lijeka na mjesto primjene. U **Tablici 2**. dan je prikaz evolucije sustava za kontrolirano oslobađanje lijeka.

Tablica 2. Prva, druga i treća generacija sustava za dostavu lijeka (prilagođeno prema (9)).

Godina		
1950	1980	2010 2040
1. generacija Kontrolirano oslobađanje	**2. generacija** Pametni sustavi dostave	**3. generacija** Modularni sustavi dostave
Oralna primjena (jednom ili dvaput dnevno)	Oslobađanje kinetikom nultog ili prvog reda	Oslobađanje inzulina (*on-off* sustav) Oslobađanje na osnovu osjetljivosti na glukozu
Transdermalna primjena (jednom dnevno, jednom tjedno)	Polimeri i hidrogelovi Oslobađanje u ovisnosti o fiziologiji okoliša Samo-regulirano oslobađanje	Ciljana dostava (protutumorski lijekovi, siRNA)
Mehanizmi oslobađanja lijeka (otapanje, difuzija, osmoza, izmjena iona)	Dostava peptida i proteina Biorazgradivi depoi	Produljeno oslobađanje (6-12 mjeseci) Minimalno naglo početno oslobađanje
	Nanočestice Dostava lijeka na mjesto djelovanja (tumori, genska terapija)	IVIVC Predviđanje PK profila na osnovu *in vitro* studija oslobađanja

Ljekovita supstancija se ne može promatrati odvojeno bez odgovarajućeg sustava za dostavu lijeka tj. formulacije. Dostava lijeka određenom kinetikom oslobađanja zahtjeva razumijevanje i poznavanje fizikalno kemijskih svojstava koja određuju sustav za dostavu tj. formulaciju i mehanizam oslobađanja. Nakon *in vitro* ispitivanja slijede *in vivo* farmakokinetičke animalne i humane studije kako bi se utvrdila prikladnost formulacije za kliničku primjenu. Kako je shematski prikazano potrebno je razmišljati o složenosti razvoja lijeka te je važno uzeti u obzir sve parametre i njihovu međusobnu povezanost. Na Slici 2. je dan shematski prikaz razvoja sustava dostave lijeka koji obuhvaća bazična istraživanja sve do kliničke primjene.



Slika 2. Shematski prikaz sustava za dostavu lijeka (prilagođeno prema (9)).

Danas se postavljaju pitanja vezana za izostanak uvjerljivog terapijskog učinka parenteralnih pripavaka s modificiranim oslobađanjem zbog nedostatka dobrih kandidata za razvoj i/ili lošu farmakokinetiku. (9)

Kada je riječ o farmakokinetičkim procesima i.m. i s.c. injekcija važan je međusoban odnos puta primjene i trajanja učinka. Ukratko, lijek se u suspenziji oslobađa i prelazi u otopinu u tekućini tkiva te se apsorbira u sustavnu cirkulaciju iz koje prelazi u odjeljak ciljanog tkiva ili organa ili se pak eliminira. Put lijeka kroz organizam najčešće se prati mjerenjem koncentracije u plazmi tijekom određenog vremena nakon primjene. Prema temeljnim postavkama farmakokinetike, koncentracija u plazmi u ravnoteži je s koncentracijom na mjestu djelovanja lijeka. Stoga, između koncentracije u plazmi i učinka lijeka postoji bolja korelacija nego između doze i učinka. Koncentracija lijeka u plazmi, osim o dozi, ovisi i o brzini i opsegu procesa: apsorpcije, distribucije, metabolizma i eliminacije, te o bolesnikovu fiziološkom statusu. Procesi koji određuju sudbinu lijeka u organizmu su:

- oslobađanje lijeka iz dozirnog oblika nakon primjene,
- apsorpcija s mjesta primjene u sistemsku cirkulaciju za sistemske lijekove
- distribucija iz sistemske cirkulacije u različite organe (reverzibilan i ravnotežan)
- metabolizam (biotransformacija) lijeka mijenjanjem njegove kemijske strukture
- te eliminacija nepromijenjenog lijeka i/ili njegovih metabolita. Pojam eliminacija opisuje zajednički učinak metabolizma i izlučivanja pri uklanjanju lijeka iz organizma.

Prednosti dostave lijeka na specifično mjesto djelovanja jesu visoka koncentracija na mjestu djelovanja kroz dulji vremenski period te značajno smanjenje doze i sistemske toksičnosti. Važno je naglasiti kako je razumijevanje ograničavajućeg faktora apsorpcije nužno za optimiranje razvoja formulacije i mehanizma dostave lijeka na mjesto djelovanja.

Najsporiji, ograničavajući proces koji kontrolira brzinu apsorpcije je oslobađanje lijeka. U parametre koji utječu na brzinu oslobađanja lijeka ubrajamo:

- veličinu čestica

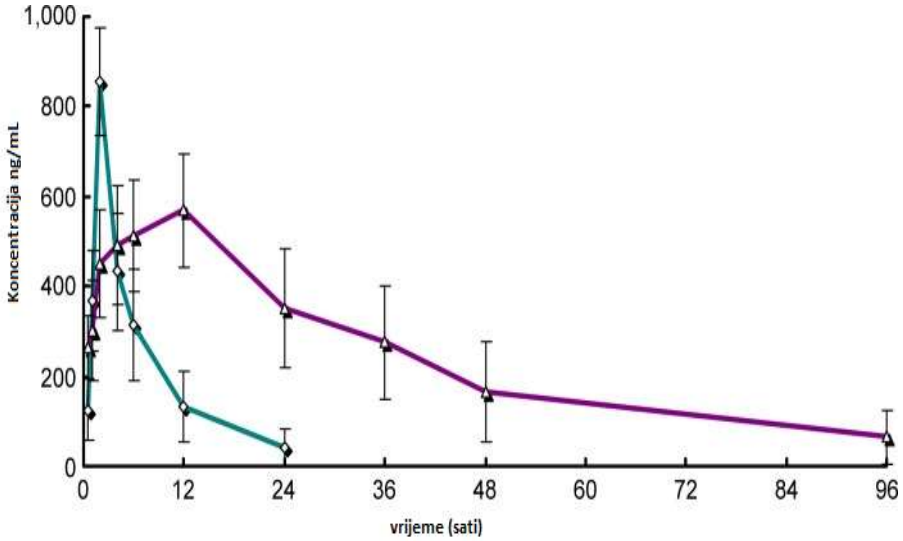
- polimorfne forme – promjena topljivosti lijeka vezana uz polimorfiju u smislu da je najstabilnija forma u pravilu slabije topljiva
- pKa lijeka i pH medija – stupanj ionizacije, promjena pH medija također rezultiraju promjenom topljivosti
- promjena viskoznosti
- utjecaj otapala – hidrofilna i lipofilna
- koeficijent razdiobe ulje/voda odnosno udio lijeka u vodi raspoloživ za apsorpciju

3.3. *In vitro* metode oslobađanja ljekovite supstancije iz parenteralnih terapijskih sustava s modificiranim oslobađanjem

Brojne su *in vitro* metode praćenja oslobađanja lijeka koje se pravilu odabiru na osnovu raspoloživosti, i svojstava lijeka te se mogu podijeliti na:

- metode uzrokovanja i odjeljivanja
- metode kontinuiranog protoka
- metode dijalize

Iako trenutno ne postoje regulativom propisane standardizirane metode, koristi se standardna farmakopejska aparatura za razvoj *in vitro* metoda. Najučinkovitiji sustav za kontinuirano oslobađanje lijeka temelji se na principu osmotske pumpe. Kod velikog broja parenteralnih pripravaka s modificiranim oslobađanjem, početna visoka koncentracija javlja se kao posljedica naglog početnog oslobađanja. Zato oslobađanje lijeka iz parenteralnih pripravaka samo djelomično slijedi kontinuirano jednoliko oslobađanje na principu osmotske pumpe. Na Slici 3. je prikazana koncentracija oslobođenog lokalnog anestetika ropivakaina iz mikrosfera kitozana u plazmi nakon subkutne primjene (10).



Slika 3. Plazma profil ropivakaina slobodnog (◊, tirkizna krivulja) i vezanog u kitozanskim mikrosferama (Δ, ljubičasta krivulja) nakon administracije u štakora (prilagođeno prema (10)).

Profil oslobađanja lijeka utječe na farmakodinamski odgovor; parametri kao što su naglo početno oslobađanje, brzina i srednje vrijeme oslobađanja, određuju maksimalnu koncentraciju u organizmu kao i vremenski period djelovanja. Veliki broj formulacija koje se izrade u fazi ranog razvoja nije moguće testirati *in vivo*, stoga je bitno razviti odgovarajuću *in vitro* metodu oslobađanja koja može predvidjeti mehanizam oslobađanja lijeka iz različitih razvojnih formulacija (7).

Za potrebe korelacije IVIVC, *in vitro* metoda treba biti jednostavna za opetovano izvođenje, robusna, validirana, bioindikativna te u idealnom slučaju, i biopredikativna. Ako se može utvrditi korelacija, *in vitro* profili oslobađanja različitih proizvodnih komercijalnih serija ljekovitog pripravka mogu se koristiti kako bi se osiguralo, i potpuno opisalo ponašanje pripravka *in vivo*, za potrebe kontrole kvalitete te bioekvivalencije (11). Također regulatorne agencije na osnovu IVIVC korelacije mogu odobriti biowaiver; što znači odobrenje za puštanje lijeka u promet na osnovu *in vitro* testova bez skupih i dugotrajnih bioekvivalencijskih ili kliničkih studija. Biovaiwer se može dobiti za promjene mjesta proizvodnje, dobavljača polaznih sirovina ili promjene u proizvodnoj opremi.

Važno je naglasiti da se IVIVC ne mora i ne može dobiti za sve parenteralne pripravke s modificiranim oslobađanjem. Ipak, i u takvim slučajevima poželjno je razviti pouzdanu metodu, *in vitro* test oslobađanja kojim se prati i potvrđuje kvaliteta ljekovitog pripravka kako bi se mogli ispuniti zahtjevi za puštanje određene serije lijeka u promet. Takav test mora biti diskriminatoran za uzorke unutar i izvan specifikacijskih granica. Specifikacijski test treba moći pokazati potpuno oslobađanje lijeka iz formulacije (oslobađanje iznad 80%) (3).

3.4. Parametri razvoja *in vitro* metode za praćenje oslobađanja lijeka iz parenteralnog pripravka s modificiranim oslobađanjem

Smjernice u razvoju *in vitro* metode:

- Uvjeti osigurane topljivosti, iako možda *in vivo* nisu prisutni, važni su u *in vitro* uvjetima kako bi se osiguralo neometano otapanje aktivne supstancije. Ako je riječ o malom volumenu, može se prilikom uzorkovanja zamijeniti čitav medij.
- Naglo početno oslobađanje – *in vitro* metoda treba biti osjetljiva da, u slučaju naglog početnog oslobađanja, može to odrediti. Dodatno, metoda treba pokazati razmjer i duljinu trajanja naglog početnog oslobađanja.
- Robusnost: Metoda treba moći pokazati utjecaj formulacije i procesa na proizvod sa stanovišta kontrole kvalitete.

Neke od predloženih smjernica uključuju:

- Odabir receptorskog medija koji rezultira ponovljivim vrijednostima brzine oslobađanja lijeka *in vitro*
- Izradu promijenjenih formulacija koje rezultiraju ciljano različitim profilom oslobađanja
- I*n vitro* i *in vivo* testiranje različitih formulacija
- Promjene i/ili odabir *in vitro* metode praćenja oslobađanja koja razlikuje promjene u formulaciji koje imaju drugačiji *in vivo* učinak. U idealnim uvjetima *in vitro* test

bi trebao oponašati uvjete i mehanizam oslobađanja koji su prisutni u organizmu na mjestu djelovanja lijeka

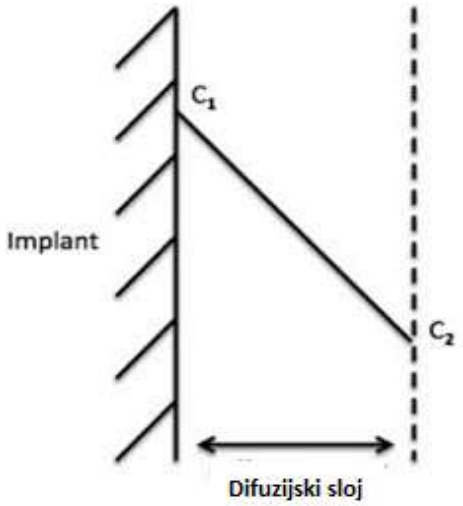
Postoji nekolicina važnih faktora nužnih za razvoj i validaciju *in vitro* metode za praćenje brzine oslobađanja aktivne supstancije za potrebe korelacije.

3.4.1. Receptorski medij

Prilikom odabira medija naglasak se stavlja na biorelevantnost. Primjerice pH vrijednost medija odabire se u ovisnosti o fiziološkoj važnosti pH, vrijednosti pH lokalno na mjestu oslobađanja, stabilnosti supstancije pri određenom pH, ionskoj jakosti, osmolalnosti, volumenu koji je podložan promjeni ovisno o oslobođenoj supstanciji, topljivosti supstancije pri određenom pH receptorskog medija što je povezano s osiguravanjem uvjeta topljivosti. Uobičajeno je da se metode i testovi za praćenje brzine oslobađanja aktivne supstancije razvijaju pri fiziološkim uvjetima na 37°C. U svrhu razvoja ubrzanih metoda provode se analize pri povišenim temperaturama (npr. na 45 °C). (4)

3.4.2. Uvjeti osigurane topljivosti u receptorskom mediju

Uvjeti osigurane topljivosti (*eng. sink*) za parenteralne pripravke definiraju se kao uvjeti pri kojima 100%-tna koncentracija lijeka u receptorskom mediju ne prelazi trećinu zasićene koncentracije (12). Ustaljena je praksa da koncentracija lijeka ne prelazi 10% koncentracije zasićene otopine. Fizikalno kemijski značaj održavanja topljivosti je osiguranje da promjena u koncentracijskom gradijentu ne utječe na brzinu i razmjer oslobađanja ljekovite supstancije. Treba naglasiti da je koncentracijski gradijent, odnosno razlika u koncentraciji odgovorna za difuziju lijeka iz nosača u fiziološki okoliš.



Slika 4. Shematski prikaz difuzijskog sloja i koncentracijski gradijent koji se formira oko implanta.

Uvjeti osigurane topljivosti postižu se odabirom medija, volumena i dodatkom površinski aktivnih tvari, suotapala. Iako u fiziološkim uvjetima tj. u organizmu na mjestu administracije ponekad nema uvjeta osigurane topljivosti, pogotovo za pripravke koji se primjenjuju intramuskularno ili subkutano, u *in vitro* uvjetima je to nužno kako bi se osigurala adekvatna topljivost lijeka i spriječilo akumuliranje degradacijskih produkata polimera. (4)

Prilikom odabira receptorskog medija potrebno je odrediti topljivost zasićene otopine određene ljekovite supstancije. Ukupni volumen medija kao i količina koja se uzrokuje u vremenu mora se preračunati kako ne bi došlo do narušavanja uvjeta osigurane topljivosti. U pojedinim slučajevima kada je ljekovita supstancija loše topljiva potrebno je prilikom svakog uzorkovanja potpuno zamijeniti receptorski medij. Metode u kojima se koristi kontinuirani protok (eng. *flow through dissolution* metode) osiguravaju topljivost zbog konstantnog protoka medija. Tako se izbjegavaju problemi odjeljivanja dispergiranog ljekovitog sustava od medija, jer je sustav izoliran ćeliji, a uzorkovanje medija vrši se iz rezervoara.

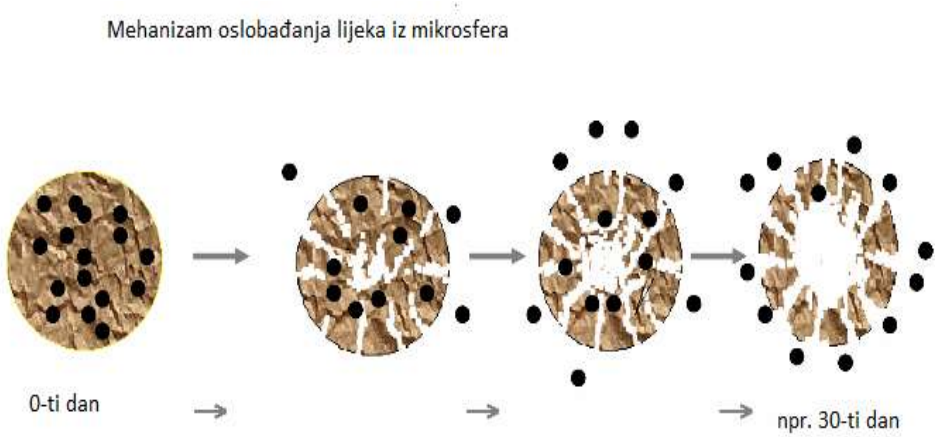
3.4.3. Robusnost *in vitro* metode oslobađanja lijeka iz parenteralnih sustava s modificiranim oslobađanjem

Vrlo je važno da metoda bude robusna kako bi se mogao ispitati utjecaj promjena u sastavu ili proizvodnom procesu na oslobađanje, te predvidjeti utjecaj promjena u fiziološkim uvjetima. Važno je, ali i zahtjevno reproducirati fiziološke uvjete u laboratorijskim uvjetima za praćenje oslobađanja. Tako se na mjestu injektiranja javlja tkivni odgovor kao što je upala ili stvaranje fibroznog tkiva što je gotovo nemoguće simulirati *in vitro.*

3.4.4. Naglo početno oslobađanje (eng. *burst release*)

Ne postoji službena definicija naglog početnog oslobađanja tzv. *„burst release"*. To je obično količina lijeka koja se oslobodi unutar prvih 24 sata nakon primjene. Neki znanstvenici za definiranje naglog početnog oslobađanja ne uzimaju određeni vremenski period nakon primjene, već period nakon kojeg dolazi do promjene brzine oslobađanja. Početno se brzina opisuje kinetikom prvog reda, nakon čega slijedi kinetika nultog reda ili vrijeme zastoja (eng. *lag* faza) u kojoj uopće nema oslobađanja. Ponekad se naglo početno oslobađanje može definirati iz količine lijeka koja se teoretski može osloboditi samo kao posljedica difuzije s površine. Problem naglog početnog oslobađanja je osobito izražen kod lijekova koji imaju relativno kratko vrijeme oslobađanja lijeka. Kod takvih se pripravaka u kratkom vremenu događa i difuzija lijeka s površine kao posljedica naglog početnog oslobađanja, te oslobađanje lijeka iz polimernog matriksa uslijed razgradnje. Znanstvenici se slažu da je potrebno definirati i uniformirati naglo početno oslobađanje kako bi se mogli uspoređivati rezultati različitih laboratorija. Naglo početno oslobađanje karakteristično je za mikrosferne sustave, koji se sastoje od monolitnih jednoliko distribuiranih čestica ili molekularne disperzije, te mikrokapsule čija unutrašnjost ima tekući sadržaj i ovojnicu koja može biti polupropusna ili nepropusna. Unutrašnjost mikrosfera može biti ispunjena krutom fazom te ovojnicom koja kontrolira oslobađanje. Naglo početno oslobađanje prikazano je na primjeru

parenteralne mikrosferne injekcije testosterona. Do naglog početnog oslobađanja dolazi zbog velikog broja molekula ljekovite supstancije na površini, dok je razgradnja mikrosfera preduvjet za oslobađanje lijeka.



Slika 5. Shematski prikaz oslobađanja lijeka iz mikrosfera.

3.4.5. Stabilnost lijeka

Čest problem sustava koji polagano otpuštaju lijekove je nestabilnost samih sustava u receptorskom mediju. Polagano otpuštajući lijekovi podložni su razgradnji koja se može desiti prije samog završetka *in vitro* testa što unosi nesigurnost u interpretaciju rezultata. Male molekule su često podložne kemijskoj razgradnji (često hidrolizi), dok su velike molekule, npr. proteini, podložni degradaciji što dovodi do stvaranja agregata. Stoga je važno odabrati medij u kojem će ljekovita supstancija biti stabilna za vrijeme trajanja *in vitro* testa. Receptorski medij treba biti što sličniji fiziološkim uvjetima na mjestu djelovanja, te je poželjno minimalno utjecati na njegov sastav kako bi se spriječila razgradnja lijeka. Promjene bi se više trebale odnositi na vremena uzorkovanja, npr. povećati učestalost uzorkovanja, ili potpuno zamijeniti medij prilikom svakog uzorkovanja. Ljekovitim supstancijama podložnim hidrolizi pH se može korigirati neposredno nakon uzorkovanja kako bi se spriječila razgradnja i gubitak uzorka. Za kvantifikaciju i određivanje sadržaja oslobođene ljekovite supstancije, uzimajući u obzir razgradnju u receptorskom mediju, neki autori koriste izosbestičnu točku

(valnu duljinu pri kojoj apsorbiraju i aktivna supstancija i degradacijski produkt). Tako se uspoređuje kumulativna količina oslobađanja pri izosbestičnoj valnoj duljini i valnoj duljini pri kojoj aktivna supstancija maksimalno apsorbira.

Važno je naglasiti da je ispitivanje stabilnosti ljekovite supstancije u određenom mediju i pri određenim uvjetima potrebno provesti prije nego se definiraju parametri *in vitro* metode.

3.4.6. Opseg *in vitro* oslobađanja

Za vrijeme trajanja pokusa trebalo bi se osloboditi najmanje 80% deklarirane količine lijeka iz parenteralnog pripravka produljenog učinka. Važno je znati da li je eventualno nekompletno oslobađanje posljedica degradacije lijeka u mediju. Na kraju *in vitro* testa potrebno je izračunati količinu lijeka preostalu u formulaciji, te bi ukupan zbroj oslobođenog i ne oslobođenog lijeka trebao odgovarati teoretskoj deklariranoj količini.

3.4.7. Važnost *in vitro* metode u fiziološkim *in vivo* uvjetima

Za vrijeme razvoja potrebno je odabrati ogovarajuće parametre metode kako bi se postiglo dobro predviđanje *in vivo*. Parametri kao što su: temperatura (fiziološka ili povišena), brzina vrtnje, uzorkovanje, pH, puferski kapacitet medija, trebaju biti podešeni kako bi što bolje opisali mehanizme oslobađanja u fiziološkim *in vivo* uvjetima. Upravo su te fiziološke varijable odgovorne za razlike u apsorpciji lijeka iz parenteralnog subkutanog pripravka. Ekstracelularni matriks je kompleksna mješavina iona, fluida, lipida, proteina i ugljikohidrata koji uključuje kolagen (protein koji čini više od 2/3 matriksa većine tkiva), fibrin (fibrilarni matriks oko rana i tumora), elastin, proteoglikani (prisutni u vezivnom tkivu) te glikozaminoglikane (heparin, hijaluron) kovalentno vezane za proteine imobilizirane u intersticiju odgovorne za hidratizaciju. U svim tkivima intersticijski kolagen i glikozaminoglikani negativnog naboja djeluju kao sito. Na prolaz lijeka kroz intersticij utječe

veličina molekula, naboj, stupanj hidrofilnosti kao i međudjelovanja s endogenim komponentama intersticijske tekućine. Formulacijske promjene, primjerice, u koncentraciji ljekovite supstancije, volumenu injektiranja, ionskoj jakosti, viskoznosti, veličini čestica i pH, mogu utjecati na brzinu i opseg difuzije s mjesta primjene. Vodenim sustavima se smanjenjem veličine čestica povećava koncentracijski gradijent i brzina apsorpcije. Za uljne, lipofilne sustave početna koncentracija lijeka ne utječe na konstantu brzine apsorpcije. Brzina i opseg apsorpcije vezana je za afinitet lijeka prema otapalu tj. nosaču u formulaciji u odnosu na intersticijsku tekućinu.

3.4.8. Metode ubrzanog oslobađanja

Za parenteralne sustave s oslobađanjem lijeka produljenim na nekoliko tjedana ili mjeseci poželjno je razviti *in vitro* metodu koja će u kraćem vremenskom periodu opisati *in vivo* mehanizam oslobađanja kako bi se takav ubrzani test mogao koristiti za potrebe razvoja formulacije (13). Ubrzano oslobađanje postiže se povišenjem temperature, promjenom pH medija, hidrodinamikom (npr. brzina vrtnje ili promjena brizne protoka), promjenom sastava medija, korištenjem suotapala, površinskih otapala, enzima i sl. Utjecaj pojedinih parametara na profil brzine oslobađanja aktivne supstancije iz parenteralnog sustava procjenjuje se model zavisnim metodama npr Weibull jednadžbom: $y(t)=Finf\ (1-exp[-(t/MDT)^b])$

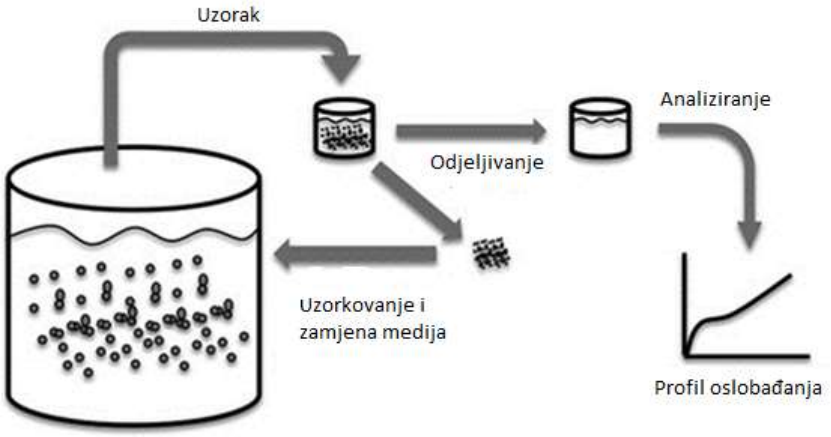
Gdje su procijenjeni parametri: F*inf*-količina lijeka oslobođena u vremenu *inf*, MDT-srednje vrijeme oslobađanja, b-nagib pravca. Weibull jednadžba koristi se za modeliranje i usporedbu *in vitro* profila za parenteralne sustave s modificiranim oslobađanjem koji nemaju ili pokazuju minimalno naglo početno oslobađanje, zanemarivo oslobađanje dirigirano difuzijom ili erozijom. Naglasak je na korelaciji baziranoj na mjerenjima u realnom vremenu, tzv. model zavisan pristup gdje se vrijednosti dobivene u realnom vremenu matematičkim modeliranjem uspoređuju s vrijednostima dobivenim pri ubrzanim uvjetima. Metode ubrzanog oslobađanja

za parenteralne sustave s modificiranim oslobađanjem mogu se koristiti za potrebe kontrole kvalitete i karakterizaciju razlika između pojedinih serija, primjerice kliničke i komercijalne serije, predviđanje dugotrajnog *in vitro* ponašanja, i načine oslobađanja u organizmu. Ubrzana metoda treba na jednaki način opisivati mehanizme oslobađanja kao i *in vitro* metoda koja se provodi u stvarnom vremenu i koja opisuje *in vivo* oslobađanje. Poželjno je da ubrzane metode kojima se prati oslobađanje lijeka u vremenu krećem u odnosu na oslobađanje u realnom vremenu budu biorelevantne, kao i da promjene kojima se postiže ubrzano oslobađanje ne mijenjaju mehanizme oslobađanja. Profili dviju ispitivanih formulacija trebaju korelirati najmanje u tri točke oslobađanja, na početku, sredini i kraju (iznad 80% oslobođenog lijeka). Ubrzane metode se mogu koristiti u razvoju formulacija, te se, nakon što se optimiraju uvjeti mogu koristiti za potrebe kontrole kvalitete proizvoda. Nakon odabira parametara, robusnost ubrzane metode pokazuje se ispitivanjem ponovljivosti (za istu i različite formulacije/serije), za formulacije/serije koje ne zadovoljavaju proizvodne specifikacije, korištenjem linearne ili nelinearne regresije za kvantifikaciju razlika u oslobađanju (14).

3.5. Podjela tehnika *in vitro* oslobađanja

3.5.1. Uzorkovanje i odjeljivanje (*eng. sample and separate*)

Tehnika uzorkovanja i odjeljivanja se često koristi zbog jednostavnosti i praktičnosti izvođenja. Na Slici 6. shematski je prikazana metoda uzorkovanja i odjeljivanja.



Slika 6. Shematski prikaz uzorkovanja i odjeljivanja (eng. *sample and separate*).

Temelji se na suspendiranju pripravaka najčešće mikro ili nanočestica u definiranom volumenu medija uz konstantno miješanje, uzorkovanje u određenim vremenskim intervalima, filtriranje ili centrifugiranje uz nadoknadu medija. Mikrosferni sustavi koji imaju inkorporiran lijek koji se produljeno oslobađa nanose se u posudu koja sadrži medij, te se oslobađanje lijeka iz sustava odvija postepeno, kroz vrijeme. Odabir medija temelji se na topljivosti lijeka i stabilnosti za vrijeme trajanja pokusa. Tehnika uzorkovanja i odjeljivanja koristi se i za implante. Za vrijeme razvoja takve metode optimira se brzina miješanja, volumen medija, tehnike odjeljivanja i volumen uzorkovanja. Modifikacije uključuju miješanje, veličinu i volumen posude koji može varirati od npr. tuba ili vijala (<10 ml) ili pak veliki volumeni od 100-400 ml. Brzina miješanja je važna jer sprječava stvaranje agregata. Poželjno je koristiti brzinu miješanja koja odgovara fiziološkim vrijednostima protoka, što je oko 100 okretaja u minuti. Kod ubrzanih metoda povećava se brzina miješanja. Za homogeno miješanje koriste se magnetske miješalice, rotirajući inkubator, rotacijske boce, a ima i razvijenih metoda u kojima se sustav uopće ne miješa. Volumen medija u prvom redu ovisi o topljivosti ljekovite supstancije, ali i o aparaturi koja se koristi. Brojni su primjeri razvijenih modela s različitim volumenima receptorskog medija od nekoliko mikrolitara do nekoliko litara. Potrebno je osigurati topljivost aktivne supstancije, te se za slabo topljive lijekove medij potpuno zamjeni u svakoj točki uzorkovanja. Ponekad je potpuna zamjena medija

potrebna kako bi se spriječilo akumuliranje degradacijskih produkata u otopini. Za sustave osigurane topljivosti i stabilnosti lijeka u receptorskom mediju, volumen uzorkovanja ovisan je o osjetljivosti analitičke tehnike kojom se analit kvantificira. Za odjeljivanje uzorka koristi se centrifugiranje ili filtracija pomoću filtara različite veličine pora, te je potrebno osigurati da ne dolazi do gubitka uzorka apsorpcijom na filtre. Nakon centrifugiranja analizira se supernatant, ili se za nestabilne supstancije u mediju analizira suspendirani lijek preostao u mikročesticama. Prilikom korištenja standardne aparature (lopatice) relativno veliki volumen medija može predstavljati problem za parenteralne sustave malog volumena. Također, često se koriste površinski aktivne tvari kako bi se spriječila agregacija čestica.

Prednosti i nedostaci tehnike uzorkovanja i odjeljivanja

Metode uzorkovanja i odjeljivanja koriste standardnu farmakopejsku aparaturu 2 (lopatice). Sadržaj oslobođene ljekovite supstancije određuje se kromatografskim analitičkim tehnikama. U nedostatke tehnike ubrajaju se poteškoće prilikom odjeljivanja mikrosustava od receptorskog medija. Prilikom ultracentrifugiranja, koriste se visoke sile koje narušavaju sustave i mogu poremetiti koncentraciju u filtratu jer utječu na obrazac oslobađanja. Razgradnja analita povećava vrijeme potrebno za sedimentiranje. Također, ponovno dispergiranje degradiranih čestica je vrlo teško. Prilikom uzorkovanja filtriranjem male čestice koje nastaju zbog degradacije polimera (<10 mm) mogu dovesti do začepljenja filtra. Gubitak volumena zbog filtracije ili zamjene receptorskog medija posebno kod malih ukupnih volumena receptorskog medija može dovesti do krive interpretacije rezultata. Zbog kontinuiranog miješanja mikrosfera može doći do smanjene brzine oslobađanja.

3.5.2. Tehnika kontinuiranog protoka *(eng. continuous flow)*

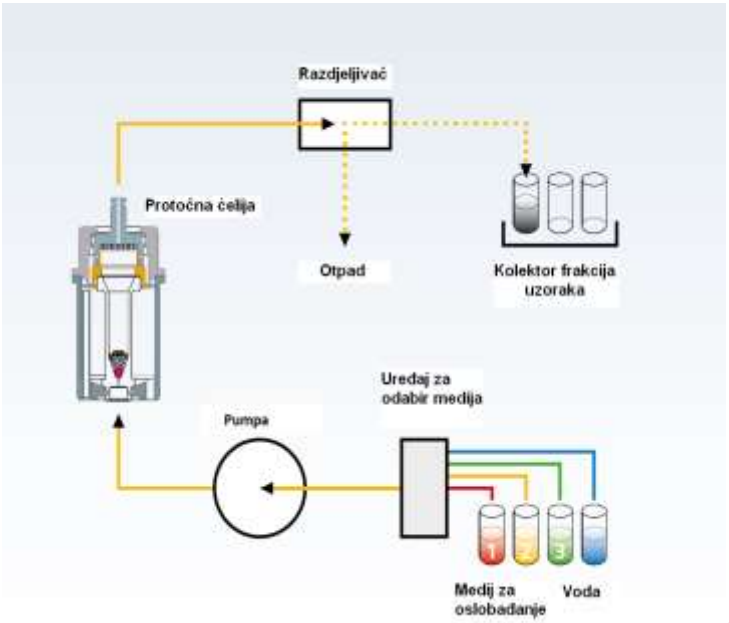
Priopćenja s radionica na kojima sudjeluju stručnjaci iz regulatornih agencija, akademije i industrije, ističu USP Aparaturu 4 kao najprikladniju za razvoj *in vitro* modela za praćenje

oslobađanja iz parenteralnih pripravaka s produljenim oslobađanjem, posebice mikrosfera. Razvijaju se priručni sustavi s kontinuiranim protokom medija kroz uzorak imobiliziran kuglicama, ali postoji i komercijalno dostupna automatizirana aparatura. Na Slici 7. je prikazana USP aparatura 4 koja se koristi u Plivi (Sotax AG, Basel, Switzerland (15)).

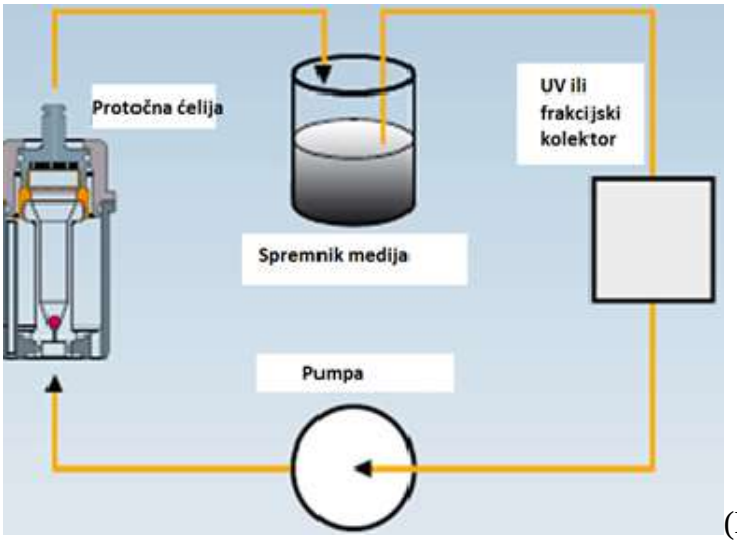


Slika 7. USP aparatura 4 (*Flow through system*) Sotax AG (prilagođeno prema (15)).

Čine je jedinica za oslobađanje djelatne tvari, pumpa, kolektor te rezervoar s medijem na magnetskoj miješalici (za zatvoreni sustav), te vodena kupelj za termostatiranje sustava. Koristi se zatvoreni ili otvoreni sustav s razlikom u jednokratnom prolasku medija kroz otvoreni sustav ili kontinuiranom recikliranju medija u zatvorenom sustavu. Uzorak se nanosi u ćelije termostatirane na određenoj temperaturi, pumpa osigurava odgovarajući protok medija kroz ćelije tijekom analize. Postoje više tipova ćelija i adaptera za različite terapijske sustave. Modifikacije Aparature 4 se često koriste za praćenje oslobađanja lijeka iz mikrosfernih i mikročestičnih parenteralnih pripravaka s produljenim oslobađanjem. Na Slikama 8.A. i B. dan je shematski prikaz USP Aparature 4 otvorenog i zatvorenog sustava.



(A)



(B)

Slika 8. *Flow through* otvoreni (A) i zatvoreni sustav (B) (prilagođeno prema (16)).

Otvoren sustav predstavlja fiziološki klirens lijeka s mjesta oslobađanja (subkutana ili intramuskularna primjena) što utječe na kinetiku oslobađanja lijeka iz sustava dirigiranih difuzijom. Prilikom korištenja kontinuiranog protoka koriste se staklene kuglice koje pomažu u imobiliziranju npr. mikrosfera ili depo-a, te osiguravaju laminaran protok. Pumpa regulira brzinu protoka u rasponu od 0.4 ml/min do 200 mL/min. Brzina protoka utječe na sustave koji su dirigirani brzinom oslobađanja; na hidrataciju materijala i posljedično difuziju. Odabir

vremena trajanja testa ovisan je o formulaciji i topljivost aktivne supstancije u receptorskom mediju. U svakoj vremenskoj točki uzorkovani volumen medija zamjenjuje se istim volumenom svježeg. Metoda određivanja sadržaja aktivne supstancije u *in vitro* testu treba biti prilagođena kvantificiranju niskih koncentracija oslobođene djelatne tvari. Za kvantifikaciju se najčešće koristi tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC).

Prednosti i nedostaci tehnike kontinuiranog protoka

Prednost korištenja kontinuiranog protoka je simulacija *in vivo* fiziološkog okoliša osiguravanjem konstantnog cirkuliranja malenog volumena medija kroz imobilizirane staklene kuglice. Prilikom hidratizacije čestica dolazi do razgradnje matriksa te difuzije i oslobađanja lijeka. To je najčešće automatizirani sustav kojim se vrši uzorkovanje i cirkuliranje medija. Korištenjem metoda kontinuiranog protoka izbjegavaju se problemi odjeljivanja dispergiranog sustava od medija, jer je mikrosustav izoliran u ćeliji, a uzorkovanje medija vrši se iz rezervoara. Mogu se koristiti i optička vlakna kojima se omogućava *in situ* mjerenje u stvarnom vremenu trajanja pokusa. Optička vlakna se postavljaju u rezervoar medija kako bi se izbjegla interferencija neotopljenih dispergiranih mikrosfera. *In situ* mjerenje omogućava istovremeno kvantificiranje višestrukih vremena uzorkovanja i potpuno opisivanje profila oslobađanja. Zatvoreni sustav koristi recirkulaciju medija što je, ako su zadovoljeni uvjeti topljivosti, pogodnije prilikom uzorkovanja i potrošnje medija. Najčešći problemi su tehničke prirode; začepljenje filtra i adsorpcija lijeka na staklene kuglice i cijevi unutar sustava. U većini slučajeva niži protok rezultira nepotpunim produlje, vjerojatno zbog smanjene hidratacije i razgradnje polimernog matriksa, te, kao posljedice toga, nižeg oslobađanja. Nakon što se polimer hidratizira lijek se oslobađa kombinacijom procesa difuzije i erozije. Zbog degradacije polimera dolazi do začepljenja filtra i varijacije u protoku što dovodi do visokog tlaka u sustavu.

3.5.3 Tehnika dijalize

Uzorak se nalazi u dijalizacijskoj vrećici te je fizički odijeljen od receptorskog medija. Dijaliza se koristila za praćenje oslobađanja iz uljnih depo formulacija supozitorija, injekcija hidrofobnih lijekova i liposoma (17). U novije vrijeme *in vitro* metode zasnovane na dijalizi koriste se i za mikro i nanočestice, implante, micele, mikrosferne sustave. Zbog razlike u koncentraciji stvara se difuzijski gradijent te uzorak difundira u receptorski medij. Odabir medija temelji se na topljivosti lijeka i stabilnosti za vrijeme trajanja *in vitro* testa. Difuzija lijeka iz dijalizacijske vrećice u vanjski medij može biti povećana miješanjem i smanjenjem nemješljivog vodenog sloja. Veličina pora dijalizacijske membrane (načinjena od celuloze različitih MWCO *eng. molecular weight cut off*) može varirati. Uobičajeno se koristi veličina pora deset puta veća od molekulske mase aktivne supstancije kako bi lijek, zbog koncentracijskog gradijenta, mogao neometano difudirati. Prilikom odabira veličine pora važno je da membrana ne predstavlja prepreku za difuziju aktivne supstancije. Veličine pora dijalizacijske vrećice kreću se u vrlo širokom rasponu; npr. MWCO 3500 Da za goveđi serum albumin do MWCO 30 kDa za peptide. Dijalizacijske metode pogodne su za praćenje oslobađanja malih molekula, peptida, proteina. Kako bi se osiguralo neometano difundiranje potrebno je osigurati dovoljnu razliku u volumenu unutar dijalizacijske vrećice u odnosu na vanjski medij. Poželjno je da volumen bude 10 do 100 puta manji ovisno o topljivosti u mediju. Pritom se uvjeti osigurane topljivosti ne smiju kompromitirati. Miješanje osigurava jednoliku raspodjelu lijeka u receptorskom mediju i pomaže prilikom osiguravanja koncentracijskog gradijenta. U dvije osnovne kategorije dijalize ubrajaju se metode u kojima se pripravak nalazi unutar dijalizacijske vrećice a uzrokuje se u receptorskom mediju. Druga, obrnuta dijaliza, pretpostavlja da se uzrokuje receptorski medij koji se nalazi unutar dijalizacijske vrećice. Uzorak se u sustavima obrnute dijalize može miješati, ne dolazi do

stvaranja agregata, a također je osigurana i maksimalna topljivost (18). Na Slici 9. su shematski prikazane dijaliza i obrnuta dijaliza.



Slika 9. Shematski prikaz dijalize (lijevo) i obrnute dijalize (desno).

Prednosti i nedostaci dijalize

Dijaliza je jednostavna za izvođenje i ne zahtijeva složenu aparaturu i sustave. Uzorkovanje i zamjena medija pojednostavljena je korištenjem dijalizacijske membrane koja fizički odjeljuje uzorak od receptorskog medija. *In vitro* metode oslobađanja korištenjem tehnika dijalize dobro koreliraju s injekcijama za subkutanu i intramuskularnu primjenu gdje je uzorak praktički imobiliziran i okružen statičkim slojem medija koji uzrokuje polaganu difuziju lijeka jer nema uvjeta osigurane topljivosti. Postizanje ravnoteže s vanjskim receptorskim medijem ovisno je o površini membrane te se ravnoteža postiže polagano ako je površina mala. Nedostatak korelacije s *in vivo* profilima vezan je s nemogućnošću homogenog miješanja unutar dijalizacijske vrećice, te stvaranje agregata. Nedostatak miješanja rezultira statičnim uvjetima te nedovoljnom hidratacijom polimera i smanjenom brzinom oslobađanja. Agregati predstavljaju problem kod mikročestičnih parenteralnih sustava jer može doći do nekompletnog oslobađanja i velike varijabilnosti. Problem dijalizacijskih metoda kod emulzija ili liposoma je često prebrzo oslobađanje aktivne supstancije iz formulacije, te narušavanje uvjeta topljivosti unutar dijalizacijske vrećice. Do narušavanja može doći ako je oslobađanje lijeka iz parenteralnog sustava brže nego difuzija lijeka kroz membranu.

3.5.4. Standardne farmakopejske metode

U farmaceutskoj industriji testovi brzine oslobađanja aktivne supstancije iz farmaceutskog oblika (eng. *dissolution test*) su važno „oruđe" u razvoju i kontroli kvalitete. Iako razvijeni za čvrste dozirne oblike i oralnu primjenu s trenutnim i modificiranim oslobađanjem, posljednjih godina *in vitro* testovi oslobađanja koriste se i za ispitivanje „novijih" farmaceutskih oblika, kao što su: tablete za žvakanje, transdermalni flasteri, polučvrsti preparati za lokalnu primjenu, supozitoriji, implantati, preparati s mikročesticama za parenteralnu primjenu, suspenzije i liposomski preparati. Za čvrste dozirne oblike za oralnu primjenu s trenutnim oslobađanjem," dissolution test" se opisuje kao test otapanja, budući da je cilj da se ljekovita supstanca brzo otopi u mediju. Za parenteralne farmaceutske pripravke s produljenim oslobađanjem, transdermalne sustave, supozitorije, ispitivanje se prije svega opisuje kao „test oslobađanja ljekovite supstance" ili kao „test *in vitro* oslobađanja". Zbog razlika u formulaciji lijekova, koje se ogledaju u veoma različitim fizikalno kemijskim svojstvima aktivnih i pomoćnih supstanci koje čine farmaceutski pripravak različitih mehanizama oslobađanja, nije moguće predložiti jedinstven test koji će biti primjenjiv na sve farmaceutske oblike i na svaki pojedinačno. Točnije, aparature, postupci i tehnike razlikuju se između ispitivanja, tako da metoda mora biti prilagođena određenoj grupi farmaceutskih pripravaka ili čak pojedinačnom pripravku koji se ispituje. Ipak, opći principi moraju se poštovati i kod testova za *in vitro* oslobađanje iz „novijih" farmaceutskih oblika. Ispitivanje brzine oslobađanja predstavlja test važan za biofarmaceutsku karakterizaciju farmaceutskih oblika za parenteralnu primjenu, a isto je koristan za potvrdu kvalitete proizvoda (različite serije istog farmaceutskog oblika lijeka) unutar definiranog seta kriterija prihvatljivosti. Ispitivanje brzine oslobađanja aktivne supstance iz farmaceutskog oblika lijeka omogućava njegovu procjenu u fazi razvoja, kontrole kvalitete, prilikom ispitivanja stabilnosti.

U Tablici 3. je dan pregled različitih uređaja (aparatura) za praćenje oslobađanja ljekovite supstance iz čvrstih, tekućih, polučvrstih i „novijih" farmaceutskih oblika (19).

Tablica 3. Dozirni pripravci i aparature za praćenje brzine oslobađanja.

Dozirni pripravak	**Aparatura**
Čvrsti oralni pripravci	Košarice, Lopatice, Rotirajući cilindri ili Protočne ćelije
Oralne suspenzije	Lopatice
Tablete za žvakanje	Košarice, Lopatice, Rotirajući cilindri ili Protočne ćelije
Transdermalni flasteri	Aparatura s lopaticom iznad diska
Polučvsti pripravci za lokalnu primjenu	Franz difuzijska ćelija
Supozitoriji	Lopatice, modificirane košarice, zatvorena dvostruka protočna ćelija dvostruka protočna ćelija
Praškovi i granule	Modificirana protočna ćelija s uzorkom za prašak/granule
Parenteralni pripravci (mikrosfere, mikročestice)	Modificirana protočna ćelija
Parenteralne depo formulacije	Rotirajuća dijalizacijska ćelija
Implantati	Modificirana protočna ćelija, shake flask metoda

USP Aparatura 1 (Košarice)

Koristi se na način da se dijalizacijska vrećica smješta unutar košarice. Aparatura nije prikladna za ispitivanje brzine oslobađanja iz mikro ili nano sustava, kao ni suspenzija, jer se takva vrsta uzoraka ne može fizički zadržati unutar košarice, a koriste se i velike količine medija.

USP Aparatura 2 (Lopatice)

Razvijena za čvrste dozirne oblike, ali se koristi i za parenteralne formulacije s produljenim oslobađanjem. Kod mikro sustava uzorak se dispergira u relativno velikoj količini receptorskog medija (500 mL ili 900 mL) uz konstantno miješanje. Uzorkovanje se provodi u definiranim vremenskim intervalima, nakon čega slijedi filtriranje otopljene frakcije lijeka kroz membranske filtre. Nedostatak je, kao i kod Aparature 1, mogućnost korištenja isključivo

relativno velikog volumena medija što je nepraktično ako je količina uzorka ograničena, te kao kod svih metoda uzorkovanja i odjeljivanja dolazi do gubitka uzorka.

USP Aparatura 4 (Flow-Through Cell)

USP Aparatura 4, prvotno razvijena za čvrste dozirne oblike s kontroliranim oslobađanjem, često se koristi kao aparatura izbora za razvoj *in vitro* metoda za parenteralne sustave s kontroliranim i produljenim/odgođenim oslobađanjem. Modificira se korištenjem adaptera s dijalizacijskom vrećicom koji se postavlja unutar ćelije. Koristi za razvoj metoda za oslobađanje iz liposomskih sustava, nanoemulzija i suspenzija (20). Korištenje kuglica unutar adaptera sprječava agregaciju uzorka, što osigurava laminaran protok, kontinuirano oslobađanje, te smanjenu varijabilnosti uzoraka.

USP Aparatura 3 se sastoji od cilindra te se ne koristi za razvoj *in vitro* metoda za parenteralne sustave. *USP Aparatura 5* (lopatice iznad diska) i *Aparatura 6* (cilindar) modificirane su verzije Aparature 1 i 2. Uglavnom se koriste za transdermalne pripravke, dok se *Aparatura 7* (reciprocirajući cilindar) koristi za transdermalne pripravke i stentove. U Tablici 4. pobrojane su *in vitro* metode oslobađanja propisane od strane američke regulatorne agencije (FDA) za parenteralne formulacije na tržištu (21).

Tablica 4. FDA metode za parenteralne lijekove dostupne na tržištu.

Lijek	**Vrsta ljekovitog pripravka**	**USP aparatura**	**Opis *in vitro* metode**
Azacitidine	parenteralna suspenzija		Potrebno razviti metodu.
Bethamethasone acetat/bethamethasone Na phosphate	parenteralna suspenzija	USP 4 (protok 8 ml/min)	0.05% NaLS, pH 3.0, USP 4 i ako je primjenjivo USP 2 za potrebe komparativne evaluacije Agencije
Doksorubicin HCl	parenteralna (liposomi)		Razviti - metodu oslobađanja pri pH 6.0±0.05 i 47^{0}C. Replicirati za 12 vijala
Leuprolide acetate	parenteralna (produljeno djelovanje)		Razviti USP 4 i ako je primjenjivo USP 2 za potrebe komparativne evaluacije Agencije
Medroxyprogesterone acetate	parenteralna suspenzija	Test 1: USP 4; 22.6 mm, 13 g kuglica, 17	Test 1: 0.5% NaLS u vodi, otvoreni sustav Test 2: 0.35% NaLS u vodi,

		mL/min Test 2: USP 2, 50 rpm	50 rpm
Methylprednisolone acetate	parenteralna suspenzija	USP 4	0.55% NaLS
Naletrexone	parenteralna suspenzija	USP 4 USP 2	PBS s 0.02% Tween i 0.2% Na Azid, pH 7.4, osmolalnost 270 mOsm) ili drugi odgovarajući medij. Razviti USP 4 metodu i ako je primjenjivo USP 2 za potrebe komparativne evaluacije Agencije
Octreotide injection	parenteralna (produljeno djelovanje)	USP 4 USP 2	Razviti USP 4 metodu i ako je primjenjivo USP 2 za potrebe komparativne evaluacije Agencije
Paliperidone Palmitate	parenteralna suspenzija	USP 2, 50 rpm.	0.001M HCl s 0.489% Polysorbat 20 na 25.0±0.5^{0}C, 900 mL
Risperidone	parenteralna	USP 4 USP 2	Razviti USP 4 metodu i ako je primjenjivo USP 2 za potrebe komparativne evaluacije Agencije
Triamcinolone acetonide	parenteralna suspenzija	USP 4 USP 2	Razviti USP 4 metodu i ako je primjenjivo USP 2 za potrebe komparativne evaluacije Agencije
Triptorelin pamoate	parenteralna suspenzija	USP 2, 200 rpm.	Voda:MeOH (95:5), rekonstitucija vijala u 2 mL vode za injekcije, 500 mL medija na 37^{0}C
Verteporfin	parenteralna		Razviti metodu za karakterizaciju *in vitro* oslobađanja
Aripiprazole	intramuskularna suspenzija	USP 2, 50 rpm	0.25% NaLS, 900 mL

Za većinu parenetralnih proizvoda FDA preporuča korištenje farmakopejskih Aparatura 2 i 4.

3.6. Usporedba *in vitro* profila oslobađanja

Metode *in vitro* oslobađanja koriste se za potrebe razvoja, proporcionalnog povećanja serije s laboratorijskog na industrijsko mjerilo proizvodnje (eng. *scale up*), te kao test kontrole kvalitete za provjeru kvalitete gotovog pripravka nakon izmjena u procesu proizvodnje. *In vitro* test brzine oslobađanja, nije zamjena za *in vivo* procjenu biološke raspoloživosti i bioekvivalentnosti. Metoda kojom se opisuje profil oslobađanja treba biti diskriminatorna za uzroke unutar i izvan specifikacijskih granica. *In vitro* metode koriste se za usporedbu brzine i mehanizma oslobađanja za vrijeme farmaceutskog razvoja, promjene mjesta proizvodnje, *scale-up*-a, promjene proizvodne opreme. Iako nema specifičnih regulatornih smjernica za

parenteralne pripravke, općenito se slijede principi za čvrste oralne dozirne oblike s produljenim oslobađanjem. Kada je riječ o manjim formulacijskim promjenama, dovoljno je usporediti nekoliko točaka profila oslobađanja iz ljekovitog pripravka formuliranog prije, te nakon promjene. Za značajne promjene među formulacijama potrebno je usporediti kompletne profile oslobađanja. Za usporedbu profila koriste se model nezavisne i model zavisne metode. Model nezavisna metoda koristi dva statistička faktora; faktor razlike (*f* 1) i faktor sličnosti (*f* 2). Kako bi se dva profila smatrala sličnima, *f* 1 treba biti manji ili jednak 15 a *f* 2 veći ili jednak 50. U zavisnim metodama, odgovarajući model se koristi za praćenje profila oslobađanja. Dostupni profili i podaci oslobađanja nastali prije i nakon formulacijske promjene kojom se mijenja mehanizam oslobađanja koreliraju se s odgovarajućim modelom, te se određuje sličnost i granice unutar kojih se dobiva odgovarajući profil oslobađanja. (22)

3.7. Korelacije *in vivo in vitro* (IVIVC)

Američka regulativa (FDA), definira IVIVC kao prediktivni matematički model koji opisuje vezu između *in vitro* svojstava (obično brzina ili količina „*dissolution*"-a ili oslobađanja lijeka) i *in vivo* odgovora (npr. koncentracija lijeka u plazmi ili količina lijeka koji se apsorbira). IVIVC je namijenjen za precizno predviđanje očekivane karakteristike bioraspoloživosti farmaceutskog pripravka na osnovu odnosno profila oslobađanja (2). U razvoju lijeka pomaže u prepoznavanju ciljane formulacije, u odabiru biorelevantne *in vitro* metode koja najbolje predviđa brzinu otapanja lijeka u *in vivo* uvjetima, u obrazloženju odabira odgovarajuće metode regulatornim tijelima za potrebe registracije proizvoda. Korelacija se može koristiti kao zamjena za *in vivo* bioekvivalencijske studije i ispitivanje bioraspoloživosti ukoliko se promjeni postojeći proizvodni postupak ili se uvodi nova doza na tržište (eng. *biowaiver*). IVIVC je osnova za *biowaiver* u kojem se *in vitro* profili oslobađanja ljekovite supstancije koriste kao surogat za bioekvivalencijske studije. Važno je naglasiti da

regulatorne agencije neće odobriti *biowaiver* ako je riječ o značajnim promjenama u formulaciji koje mogu utjecati na mehanizam oslobađanja lijeka. Tako se izostanak *in vivo* studije ne može očekivati prilikom promjena jakosti doze prije nego se uspostavi IVIVC za višestruke doze. Ako je apsorpcija lijeka i*n vivo* uvjetovana brzinom otapanja, što je karakteristika većine parenteralnih lijekova s produljenim oslobađanjem, tada postoji mogućnost uspješne *in vitro-in vivo* korelacije. Preduvjet je odabir pogodne *in vitro* metode i receptorskog medija koji najbolje pokazuje razlike među formulacijama. Za uspješan IVIVC potrebno je da; lijek ima linearnu farmakokinetiku, nema usku terapijsku širinu i veliku varijabilnost, te da je supstancija u ljekovitom obliku jednaka mjerenoj aktivnoj supstanciji u sistemskoj cirkulaciji.

In vitro i *in vivo* testovi rade se iz iste serije lijekova. *In vivo* podaci za razvoj IVIVC moraju sadržavati sljedeće:

- ukriženi pokus na zdravim dobrovoljcima
- dovoljan broj subjekata za pouzdane srednje vrijednosti koncentracijskih profila
- standardiziran pokus bez prisutnosti hrane
- uključivanje ljekovitog oblika za sistemsku analizu (IV formulacije ili oralne otopine kako bi se dobila težinska funkcija potrebna za dekonvoluciju podataka)

In vitro krivulje brzine oslobađanja nije moguće direktno korelirati s *in vivo* koncentracijskim krivuljama već u sljedeća dva koraka:

- Retrospektivno izračunavanje *in vivo* brzine oslobađanja iz vrijednosti koncentracija u plazmi različitih formulacija
- Kvantitativna korelacija *in vitro* i *in vivo* brzine krivulja otapanja

Za izračun *in vivo* brzine oslobađanja/apsorpcije iz koncentracija u plazmi najčešće se koristi jedna od navedenih metoda: model ovisna (Wagner-Nelson, Loo-Riegelman) ili model neovisna (konvolucija, dekonvolucija). Postoji više kategorija povezanosti *in vitro* i *in vivo* podataka. Prilikom izrade modela korelacije, kada se, primjerice koristi kategorija A povezanosti *in vitro* i *in vivo* podataka, kvantitativna korelacija se uspostavlja korištenjem linearne ili nelinearne regresije *in vitro* i *in vivo* podataka iste formulacije. Važno je procijeniti pogrešku metode u predviđanju *in vivo* bioraspoloživosti. Greška procjene za vršnu koncentraciju ili površinu ispod krivulje računa se na slijedeći način:

$$\% \text{ greške procjene} = \frac{(\text{izmjereni farmakokinetski parametar} - \text{predviđeni farmakokinetski parametar}) * 100}{\text{predviđeni farmakokinetski parametar}}$$

Ako je greška procjene manja od 10%, znači da je razvijena korelacija *in vitro in vivo* koja dobro predviđa *in vivo* bioraspoloživost za potencijalne formulacije izbora.

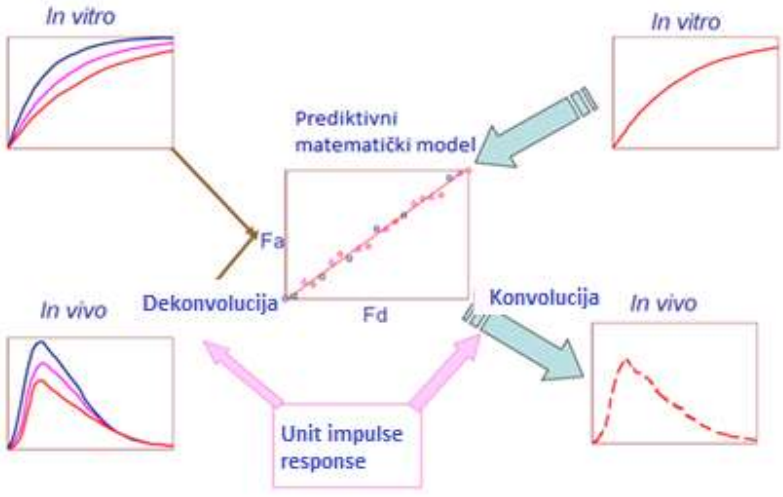
3.8. Oslobađanje lijeka *in vivo* nakon primjene

Za postizanje korelacije nužno je imati profil oslobađanja u krvi tj. *in vivo* profil. Kod lijekova koji se primjenjuju sistemski to jednostavno znači mjerenje koncentracije lijeka u krvi. Dobiveni podaci uspoređuju se s *in vitro* profilima oslobođenog lijeka i evaluiraju za moguću *in vitro in vivo* korelaciju. Za implante koji djeluju lokalno, razine lijeka u krvi nikad ne postižu koncentracije koje se mogu odrediti. Mjerenje razine lijeka lokalno, na izoliranom području djelovanja, predstavlja problem jer je riječ o vrlo invazivnim procedurama. Najčešće se koriste tehnike mikrodijalize. Stoga je relativno teško postići IVIVC za lokalno djelujuće parenteralne sustave. Važno je naglasiti da se sve više koriste životinjski modeli jer su korisni u slučajevima kada su tehnike mjerenja previše invazivne. Prilikom usporedbe životinjskih i humanih sustava treba biti oprezan te uzeti u obzir fiziološke sličnosti i razlike. Ponekad je odabrani životinjski model upravo zbog fizioloških razlika neprikladan, te nije moguće

utvrditi korelaciju zasnovanu na životinjskim podacima. Sukladno Europskoj agenciji za evaluaciju medicinskih proizvoda, ovisno o putu primjene, može se odobriti *biowaiver* zasnovan na korelaciji iz životinjskih studija. Iz dostupne literature može se zaključiti da se radi na povezivanju podataka dobivenih iz životinjskih studija, korištenjem životinjskih modela s humanim podacima, te je dostupno sve više literature koja opisuje uspješne životinjske studije s razvijenim modelima korelacije (23), (24).

3.9. Tipovi korelacije

Postoji više kategorija povezanosti odnosno korelacije. Kategorija A je najinformativnija i najpotpunija korelacija koje se preporuča od strane američke regulatorne agencije FDA. Riječ je o korelaciji pojedinih vrijednosti dobivenih *in vivo* i onih *in vitro*. To je funkcionalna povezanost svih točaka *in vitro* krivulje otapanja lijeka tijekom vremena i *in vivo* krivulje oslobađanja lijeka u sistemsku cirkulaciju tijekom vremena. Usporedba profila može pokazati linearnu ili nelinearnu povezanost. Primjer linearne korelacije kategorije A dan je na Slici 10.



Slika 10. Shematski prikaz kategorije A *in vitro in vivo* korelacije (prilagođeno prema (2)).

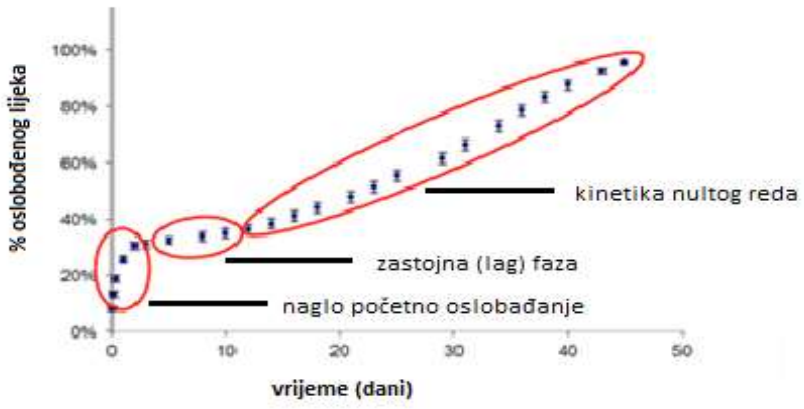
Osnovni preduvjet za korelaciju kategorije A je identičan mehanizam odgovoran za oslobađanje lijeka iz formulacija *in vitro* kao i *in vivo*. Obično razvoj korelacije A kategorije uključuje optimalno 3 ili više formulacija koje se razlikuju u brzini oslobađanja (sporu,

srednju i brzu). Za IVIVC je potrebno imati *in vivo* plazma koncentracijske profile odabranih formulacija nakon čega se dekonvolucijom procjenjuje *in vivo* apsorpcija ili oslobađanje istih. Potom se utvrđuje korelacija/relacija između procijenjene frakcije *in vivo* oslobođene/apsorbirane i frakcije *in vitro* oslobođene korištenjem linearnog ili nelinearnog modela. Obzirom na moguće intrinzične razlike *in vitro* i *in vivo* brzine oslobađanja ponekad je potrebno napraviti vremenski pomak ili pomak skale. Na kraju se procjenjuje predikcija razvijenog IVIVC-a interno i/ili eksterno. Prema FDA regulativi kriteriji prihvatljivosti su slijedeći: za internu predikciju prosječan postotak greške predikcije od 10%, (niti jedna vrijednost ne smije biti preko 15%). Ako kriterij nije zadovoljen primjenjuju se zahtjevi za vanjsku predikciju gdje je 10% ili manje prihvatljivo, 10-20% nije konkluzivno, vrijednosti veće od 20% se ne prihvaćaju. Navedeno znači da je razvijeni korelacijski model zadovoljavajući za određeni farmakokinetski parametar (Cmax iliAUC) (2). Kategorija B je povezanost zasnovana na statističkoj analizi momenta (npr. *in vitro* vrijeme otapanja i srednje vrijeme zadržavanja lijeka). Kategorija B je manje prediktivna i daje manje informacija u odnosu na kategoriju A. Temelji se na statističkom modelu analize u kojem se srednje vrijeme „dissolutiona“ *in vitro,* uspoređuje s njegovim srednjim vremenom *in vivo*. Nedostatak prediktivnosti korelacije B kategorije očituje se u tome da različiti *in vivo* profili oslobađanja mogu rezultirati istim *in vitro* srednjim vremenom oslobađanja lijeka. Kategorija B može pomoći u predviđanju ukupnog vremena oslobađanja *in vivo* što je vrlo važno kod parenteralnih pripravaka s produljenim oslobađanjem. Kategorija C je povezanost u točki između jednog parametra *in vitro* otapanja (npr. % otopljene ljekovite supstancije u 4 sata ili vrijeme u kojem je otopljeno 50% supstancije) i jednog farmakokinetskog parametra (npr. površina ispod krivulje (AUC), vršna koncentracija (Cmax)). Za višekratnu kategoriju C vrijedi da se više farmakokinetskih parametara uspoređuje s nekoliko točaka *in vitro* krivulje otapanja. Uobičajeno se za kategoriju C koriste *in vitro* parametri kao što su vrijeme

raspadljivosti, vrijeme postizanja određenog postotka oslobađanja lijeka, brzina oslobađanja lijeka. Farmakokinetski parametri koji se koriste su vršna koncentracija, vrijeme kada se postiže vršna koncentracija, vrijeme potrebno za oslobađanje određenog postotka lijeka, površina ispod krivulje i slično. Obzirom da se kategorija C temelji na analizi jednog parametra nije toliko informativna koliko kategorija A. Kategorija D uspoređuje *in vitro* i *in vivo* brzine oslobađanja. Riječ je o korelaciji rangiranja kvalitativnog tipa i kao takva se ne može koristit za regulatorne zahtjeve.

3.10. Korištenje korelacije *in vitro in vivo* za potrebe razvoja polimernih mikrosustava s produljenim oslobađanjem

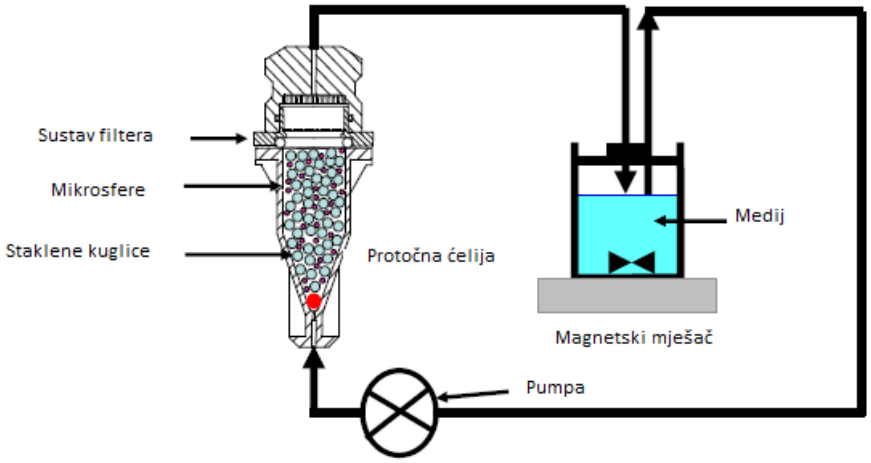
Kinetika oslobađanja lijeka iz PLGA i drugih biorazgradivih polimera kontrolirana je difuzijom i erozijom. Oslobađanje je ovisno o svojstvima polimera kao što su molekulska masa, omjer kopolimera, kristaliničnost, te o karakteristikama ljekovite supstancije: veličini čestica, morfologiji, poroznosti, dozi. Najčešće, oslobađanje lijeka iz mikrosfera ima trofazni profil: naglo početno oslobađanje, zastojno vrijeme (kontinuirano oslobađanje) gdje dolazi do difuzije i erozije polimera, te sekundarnu fazu oslobađanja koju karakterizira kinetika nultog reda. Na Slici 11. prikazan je tipičan trofazni profil oslobađanja ljekovite supstancije iz primjerice PLGA mikrosfera (16).



Slika 11. Shematski prikaz tipičnog trofaznog profila oslobađanja iz mikrosfernih sustava.

Naglo početno oslobađanje kontrolirano je difuzijom, dok su zastojno vrijeme i kinetika nultog reda kontrolirane difuzijom i erozijom. Oslobađanje lijeka iz mikrosfernih polimernih sustava je dugotrajan proces koji traje nekoliko dana ili čak mjeseci. Uspješan IVIVC model može značajno smanjiti troškove, vrijeme razvoja formulacije i optimiranje tehnološkog procesa. IVIVC se može koristiti za postavljanje „dissolution“ specifikacija te kao surogat za *in vivo* bioekvivalencijske studije u slučaju kada se uvode promjene formulacije, procesa ili mjesta proizvodnje. Stoga treba razvijati *in vitro* metode praćenja oslobađanja ljekovite supstancije koje se mogu koristiti kao indirektna mjera *in vivo* oslobađanja lijeka i biološkog djelovanja. Primjerice, poboljšana učinkovitost kemoterapeutika vezana je s konstantnom i relativno niskom koncentracijom koja se postiže enkapsulacijom kemoterapeutika u polimerni sustav, u odnosu na visoku koncentraciju koja se postiže primjenom intravenskog bolusa. Osim kemoterapeutika razvijaju se parenteralni sustavi s produljenim oslobađanjem i za druge vrste indikacija kod kojih su izražene različite nuspojave: lijekovi za mentalne bolesti, gdje je suradljivost pacijenta ključna za uspješnost terapije, proteini i druge makromolekule zbog njihove nestabilnosti u GI traktu, lijekovi s kratkim vremenom poluraspada, lijekovi s niskom topljivošću, te lijekovi podložni intenzivnom metabolizmu prolaza kroz jetra. Faktori povezani s karakteristikama same formulacije koji mogu utjecati na *in vivo* djelovanje su disperzibilnost, stabilnost, volumen injekcije, viskoznost, biokompatibilnost (25). FDA još je 2012. godine odobrila nekoliko stipendija za razvoj biorelevantnih IVIVC modela za parenteralne formulacije s produljenim oslobađanjem; biorazgradive mikrosferne injekcije i *in situ* fomirajuće gel implante. Jedna od odobrenih stipendija vezana je za suradnju više razvojnih projekata za razvoj korelacije mikrosfera risperidona. Analiza kritičnih fizikalno kemijskih svojstava pokazuje da su mikrosferne formulacije risperidona, iako slične po sastavu, osjetljive na razlike u proizvodnom procesu. *In vitro* test razvijen korištenjem USP Aparature 4 pokazuje dobru diskriminatornost i može predvidjeti *in vivo* djelovanje

mikrosfernog sustava. (26) Na Slici 12. je prikazana modificirana USP Aparatura 4 za praćenje *in vitro* brzine oslobađanja aktivne supstancije iz mikrosfera.



Slika 12. Shematski prikaz modificirane USP Aparature 4 za praćenje *in vitro* oslobađanja iz mikrosfernih ljekovitih sustava (prilagođeno prema (20)).

3.11. Metodologija *in vitro* oslobađanja

Obzirom da se lijek iz sustava s modificiranim oslobađanjem oslobađa kroz dulji vremenski period, evaluacija oslobađanja iz primjerice parenteralnih mikrosfernih sustava zahtjeva dugotrajne animalne studije ili *in vitro* metode u fiziološkim puferskim sustavima na 37^{o}C. Takve *in vitro* metode opisuju oslobađanje lijeka dajući uvid u moguće interakcije između lijeka i polimera, kao i utjecaj na brzinu i mehanizam oslobađanja (4).

3.12. Evaluacija *in vivo* podataka iz studija

Literaturno dostupni *in vivo* podaci se u velikoj mjeri zasnivaju na životinjskim modelima a najviše se koriste štakori i psi. Oslobađanje u fiziološkim uvjetima ovisno je o mikrookruženju na mjestu primjene. *In vivo* faktori koji mogu utjecati na brzinu oslobađanja dijele se u formulacijski zavisne i nezavisne faktore. Nezavisni faktori uključuju barijere za difuziju lijeka, razdiobu lijeka na mjestu primjene, volumen fluida na mjestu oslobađanja, volumen intersticijske tekućine, protok krvi, osmotski tlak, prisutnost proteina plazme,

vezanje na proteine plazme. Formulacijski zavisni faktori vezani su za određeni terapijski sustav i uključuju mehanizme razgradnje polimera, fagocitozu, upalnu reakciju, edem, fibrozno tkivo, prisutnost povećanog broja neutrofila i makrofaga. Put primjene i razlike u dubini injektiranja za intarmuskularne injekcije mogu rezultirati velikom varijabilnošću u koncentraciji lijeka u plazmi (4).

3.13. Matematički modeli za IVIVC

Korelacija kategorije A se, prema američkoj regulativi, procjenjuje u nekoliko koraka, koji uključuju dekonvoluciju *in vivo* krivulje, uspostavljanje matematičkog modela koji opisuje oslobađanje *in vitro*, te uspoređivanje udjela apsorbiranog lijeka sa frakcijom lijeka otopljenog *in vitro*.

Za procjenu *in vivo* oslobađanja(ili *in vivo* apsorpcije) u vremenu za svaku formulaciju, koristi se odgovarajuća tehnika za dekonvoluciju, kao što je, za jedno-prostorne farmakokinetske modele, Wagner-Nelson metoda:

$$\%abs = \frac{C(t) + ke * AUC(0\text{-}t)}{ke * AUC(0 - \text{inf})}$$

Pri čemu je

C(t) – koncentracija u plazmi u vremenskoj točki t

Ke – koeficijent brzine eliminacije lijeka iz organizma

AUC(0-t) – površina ispod krivulje koncentracije od nultog vremena do vremena t

AUC(0-inf) – procijenjena površina ispod krivulje koncentracije do beskonačnosti

Jedna od metoda izbora za više-prostorne farmakokinetske modele je Loo-Riegelman, dok metoda numeričke dekonvolucije ne pretpostavlja farmakokinetski model za *in vivo* podatke.

S obzirom na različita vremena uzimanja uzoraka u pokusima *in vitro* oslobađanja i *in vivo* pokusima te kako bi što bolje povezali *in vitro* i *in vivo* profile, potrebno je opisati *in vitro* profile oslobađanja matematičkim modelom. Na taj način se aproksimiraju vrijednosti

oslobođenog lijeka kontinuirano na vremenskoj skali. Kako bi, u slijedećem koraku, povezali procijenjene udjele apsorbiranog lijeka sa frakcijom lijeka otopljenog *in vitro*, najčešće je potrebno prilagoditi vremenske skale. Odnos između vremena potrebnog da se određena, predefinirana frakcija oslobodi *in vitro* i *in vivo* se može prikazati tzv Levy-grafom, te uspostaviti (poželjno) linearnu korelaciju i njome definirati pomak u vremenu. Prilagodba vremenske skale kod razvoja korelacije se može koristiti ako je jednaka za sve formulacije. Različite vremenske skale za svaku formulaciju ukazuju na nedostatak korelacije.

Slijedeći korak je uspostavljanje korelacije između *in vitro* otapanja i *in vivo* otopljenog / apsorbiranog lijeka iz dozirnog oblika. Linearna korelacija, uz prilagodbu vremenske skale, je najjednostavnija za tumačenje, kao npr:

$$\mathrm{Fabs} = \mathrm{AbsScale} * \mathrm{Diss}(\mathrm{Tscale} * \mathrm{Tvivo})$$

$$\mathrm{Fabs} = \mathrm{AbsScale} * \mathrm{Diss}(\mathrm{Tscale} * \mathrm{Tvivo} - \mathrm{Tshift})$$

Pri čemu AbsScale i Tscale označavaju faktore korekcije za apsorpciju i vrijeme *in vivo*.

Nekad je nužno definirati nelinearnu korelaciju, kako bi se prikladnije opisao sigmoidalni oblik povezanosti.

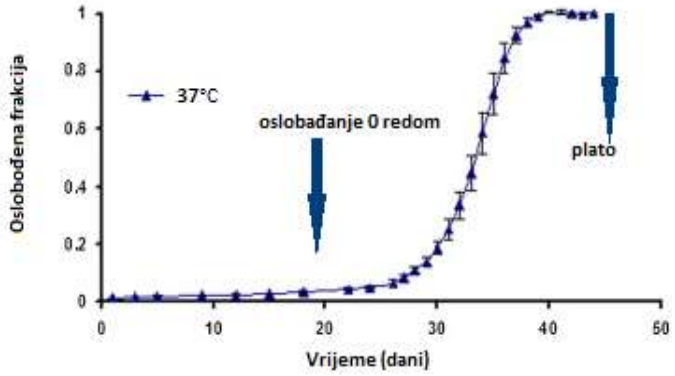
Mogući su i alternativni pristupi u razvoju korelacije kategorije A. Jedna opcija se temelji na postupku konvolucije, kojim se odnos između *in vitro* otapanja i koncentracija u plazmi modelira u jednom koraku. Metoda se zasniva na direktnom povezivanju efekata oslobađanja lijeka *in vitro* i poznate eliminacije lijeka *in vivo*. Cilj je dobiti predikciju profila koncentracija *in vivo*, koja se onda direktno uspoređuje s eksperimentalno dobivenim profilom koncentracija.

Bez obzira koja metoda se koristi za uspostavljanje korelacije kategorije A, model treba predvidjeti cijeli *in vivo* vremenski tijek koncentracija na osnovu podataka *in vitro*, što nije moguće postići za ostale kategorije korelacije.

3.14. Primjeri IVIVC za parenteralne mikrosferne sustave

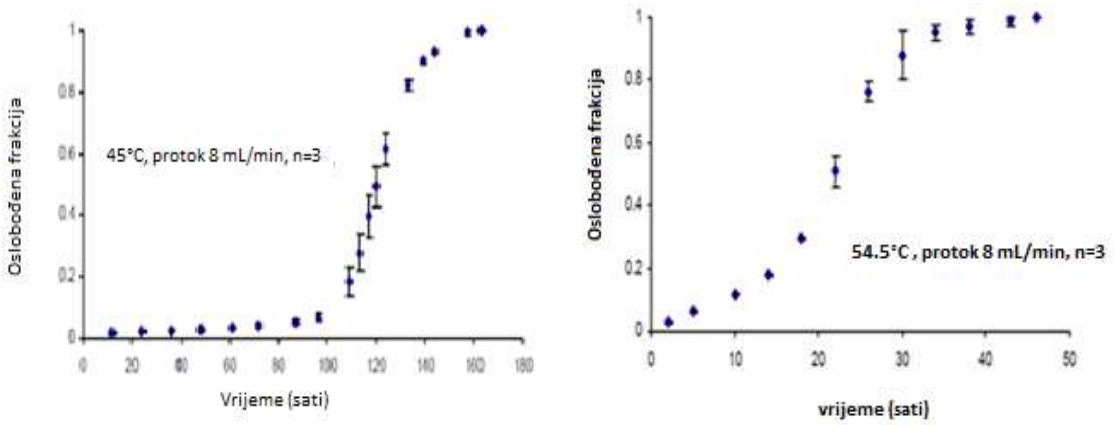
Za potrebe korelacije ispitane su karakteristike oslobađanja deksametazona iz dvije PLGA mikrosferne formulacije s različitim molekulskim masama polimera. Na primjeru, deksametazona pokazana je linearna korelacija time i dobra prediktivnost *in vitro* podataka za *in vivo* djelovanje mikrosfera. *In vitro* oslobađanje evaluirano je korištenjem zatvorenog sustava USP Aparature 4 (*Sotax*) u fosfatnom puferu pH 7.4 i pri protoku od 20 mL/min. Korištenje sustava s protočnim ćelijama spriječilo je stvaranje agregata. Razlika opsega naglog početnog oslobađanja povezana je s razlikom u duljini polimernog lanca; veća molekulska masa odgovara duljem vremenu i nižem oslobađanju vezanom s degradacijom polimera veće molekulske mase. Oslobađanje *in vitro* je pokazalo profil oslobađanja u tri faze: naglo početno oslobađanje, zastojnu fazu, i nakon toga kinetiku nultog reda. *In vivo* podaci dobiveni su korištenjem štakorskog modela koji je pokazao dvofazni profil oslobađanja; naglo početno oslobađanje i oslobađanje kinetikom nultog reda. Smatra se da je nedostatak faze zastoja *in vivo* rezultat enzimatske razgradnje koja dovodi do erozije „izvana prema unutra“ a koja je različita od tipične erozije „iznutra prema vani“ koja se dešava *in vitro*. Obzirom na razliku u vremenu postizanja sekundarne faze zastoja (kinetika nultog reda) u *in vitro* pokusu, korelacija je postignuta nakon normalizacije podataka. Za postizanje korelacije kategorije A za dvije formulacije koje se razlikuju u molekulskim masama polimera korišten je vremenski period koji slijedi kinetiku nultog reda. Obzirom da se vrijeme potrebno za postizanje plato-a razlikovalo za *in vitro* i *in vivo* podatke koristila se normalizacija podatka za obje formulacije. Normalizacija je grafički postignuta stavljanjem *in vitro* vremena na x os i *in vivo* vremena na y os. Linearna korelacija podataka dobivena je za period nakon naglog početnog oslobađanja, i normiranja vremena potrebnog za postizanje platoa (16). Za potrebe validacije *in vitro* metode i *in vitro in vivo* korelacije PLGA mikorsfera risperidona prvo je razvijena *in vitro* metoda u stvarnom vremenu oslobađanja

korištenjem USP Aparature 4, fosfatnog pufera pH 7.4 i protoka od 8 ml/min te je 10 mg mikrosfera nanešeno između staklenih kuglica protočne ćelije. Na Slici 13. prikazan je *in vitro* profil oslobađanja risperidona u realnom vremenu dobiven korištenjem protočnih ćelija. Profil pokazuje početni „burst“ (<1%) kojeg slijedi *lag* faza od tri tjedna koja je u skladu s *in vivo* podacima. Oslobađanje kinetikom nultog reda započinje nakon tri tjedna dok se nakon šestog tjedna dostiže plato.



Slika 13. *In vitro* profil oslobođenog risperidona pri 37°C (prema (27)).

Na Slici 14. prikazan je profil oslobađanja pri ubrzanim uvjetima koji su postignuti povišenjem temperature medija sa 37°C na 45°C i na 54,5°C.



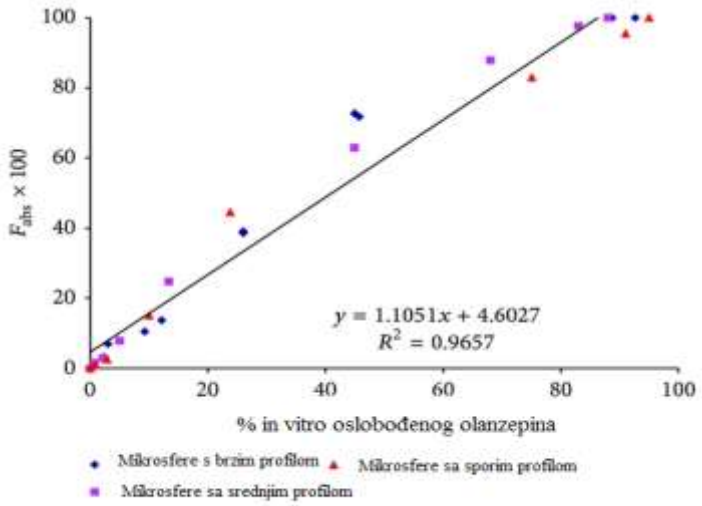
Slika 14. *In vitro* profil oslobađanja risperidona pri 45°C i 54,5°C (prema (27)).

Vidljivo je da povišenje temperature medija značajno ubrzava degradaciju PLGA polimera a time i oslobađanje risperidona. Kompletno oslobađanje pri 54.5°C postignuto je za otprilike 34 sata. Za potrebe validacije *in vitro* metode varirani su parametri kao što je brzina protoka, nanošenje uzorka na kuglice, veličina protočne ćelije i kuglica, količina nanesenih mikrosfera, pH medija, različiti analitičari, i različite USP 4 aparature. Potvrđena je robusnost i ponovljivost *in vitro* metode. Pokazan je utjecaj temperature i pH medija koji povišenjem ubrzavaju risperidonom kataliziranu degradaciju PLGA mikrosfera (27). Parenteralna formulacija Risperdal Consta® je korištena za potrebe IVIVC, te je dekonvolucijom dobiveni *in vivo* profil pokazao brže početno a sporije oslobađanje u kasnijim vremenima u odnosnu na *in vitro* profil dobiven metodom u stvarnom vremenu. Smatra se da je to posljedica razlika *in vivo* kao što su mali intersticijski volumen, nizak pH i imunološki odgovor. Linearna *in vitro in vivo* relacija postignuta je korištenjem ubrzanih *in vitro* metoda, s koeficijentom korelacije od 0,97 i 0,99 pri 50°C i 54,5°C (28). Cilj novijeg istraživanja prof. D. Burgess bio je mogućnost postizanja IVIVC-a za formulacijski ekvivalentne mikrosfere risperidona dobivene različitim proizvodnim procesima za koje je utvrđeno da utječu na fizikalno kemijska svojstva kao što je poroznost, veličina i distribucija čestica što rezultira promijenim *in vitro i in vivo* mehanizmima oslobađanja. *In vivo* podaci dobiveni su korištenjem animalnog modela (zec), dok se za dekonvoluciju koristila Loo Righelman metoda. Razvijene su *in vitro* metode uzorkovanja i odjeljivanja i protočne ćelija. Validiran je IVIVC model kategorije A koji je pokazao dobru prediktivnost *in vivo* za formulacije risperidona dobivene različitim proizvodnim procesima (29). Korelacija je dobivena i na primjeru sedmodnevne formulacije metadona u biorazgradivim PLA i PLGA mikrosferama nakon subkutane primjene. Podaci dobiveni u animalnim studijama pokazali su nisku bioraspoloživost (31.3%) PLA mikrosfera u miša. Značajno veća bioraspoloživost (99.7%) dobivena je iz PLGA mikrosfera. U *in vitro* testovima u fosfatnom puferu pH 7.4 nakon tjedan dana dobiveno je

otprilike 63% i 85% metadona iz PLA i PLGA mikrosfera što je bilo u skladu s *in vivo* farmakokinetskim vrijednostima. Razlog višeg postotka oslobođenog metadona iz PLGA mikrosfera je najvjerojatnije posljedica hidrofilnijeg matriksa što dovodi do brže hidrolitičke razgradnje u vodenom mediju koje može biti dodatno katalizirano utjecajem metadona kao bazične molekule. Autori su korelirali (A kategorija) postotak oslobođenog metadona iz formulacije na osnovu dekonvolucije *in vivo* podataka. Korelacija za PLGA se pokazala skoro idealno linearna, dok je za PLA linearna veza utvrđena do približno 40 sati nakon doziranja, nakon čega vrijednosti odstupaju od linearnosti. (30). Utjecaj veličine čestica mikrosfera te mjesta primjene (subkutana i intramuskularna) ispitan je na primjeru PLGA mikrosfera prirodnog lijeka huperzina koji se koristi za neurološka oboljenja. *In vitro* metoda uzorkovanja i odjeljivanja razvijena je u fosfatnom puferu. *In vivo* podaci dobiveni su iz animalne studije na psima kojima je lijek primijenjen intramuskularno ili subkutano. Razvijen je IVIVC model kategorije A za tri formulacije koje su se razlikovale u sastavu polimera (omjeri PLGA i veličini čestica (51.6 μm; 72.3 μm i 113.2 μm). Frakcija lijeka apsorbiranog *in vivo* izračunata je Wagner-Nelson i Loo-Riegelman metodama. Za potrebe IVIVC-a korištena je linearna regresija. Korelacija je pokazana za formulacije primijenjene intramuskularno. Pretpostavlja se da je degradacija polimera brža u potkožnom području nego u mišićima što je utjecalo na brže subkutano oslobađanje *in vivo* u odnosu na *in vitro* brzinu oslobađanja. Također, bolja korelacija dobivena je za intramuskularnu formulaciju sa sitnijim u donosu na formulaciju s krupnijim česticama. Krupnije čestice se polaganije otapaju te je difuzija huperzina sporija, što pojačava utjecaj degradacije polimera. Zbog brže *in vivo* razgradnje PLGA matriksa, krupnije čestice dodatno pojačavaju razliku *in vitro i in vivo* (24). Korelacija B kategorije je dobivena za PLGA mikrosfere peptida vapreotida. Formulacije se međusobno razlikuju u krajnjim hidrofobnim i hidrofilnim polimerima za 2 do 4 tjedna djelovanja. Korelacija je dobivena usporedbom srednjeg vremena *in vitro* brzine oslobađanja

(*eng. mean dissolution time*) s *in vivo* srednjim vremenom zadržavanja u organizmu za mikrosfere s hidrofilnim krajem (r = 0.958). Niska korelacija za hidrofobne PLGA mikrosfere vjerojatno je posljedica manje hidrofilnosti krajnjih skupina koja onemogućava početnu hidrataciju matriksa, što rezultira nižim naglim početnim oslobađanjem i smanjenom brzinom degradacije polimera, a za posljedicu ima niže oslobađanje *in vivo*. Niže oslobađanje korelira s *in vitro* produlje. Korelacija C kategorije, dobivena je za površinu ispod krivulje (eng. *area under curve*) za period od 6h do 14 dana s količinom vapreotida oslobođenom *in vitro* u istom vremenskom periodu (4). Za jedno i četiri mjesečne PLGA mikrosfere peptida ornitida bolja korelacija (%AUC) dobivena je s *in vitro* vrijednostima u acetatnom puferu pH 4.0 metodom dijalize u odnosu na 0,1 M fosfatni pufer pH 7,4. Vjerojatni razlog je bolja topljivost peptida u kiselijem puferu. *In vitro* oslobađanje u 0,1 M fosfatnom puferu pH 7,4 bilo je niže nego *in vivo* (31). Razlike u profilima brzine oslobađanja u različitim puferima ukazuju na važnost *in vitro* testiranja i odabir pufera odnosno medija za praćenje oslobađanja u ovisnosti o stabilnosti proteina, te opsegu apsorpcije. Usporedba *in vivo* oslobađanja (korišten je animalni, štakorski model) proteina lizozima s *in vitro* podacima dala je bolju korelaciju u glicinskom puferu pH 2,5 u odnosu na fosfatni pH 7,4 i acetatni pH 4,0 pufer. Korelacija se može povezati s fiziološki kiselo kataliziranom degradacijom PLGA polimera što bolje simulira kiseli glicinski pufer. Ovaj primjer pokazuje važnost pravilnog odabira receptorskog medija te činjenicu da fiziološki pH ne daje uvijek dobar uvid u uvjete koji su prisutni u organizmu (32). Autori D'Souza i DeLuca u svojim su publikacijama opisali oslobađanje aktivne supstancije iz više PLGA mikrosfernih formulacija olanzepina koje su se razlikovale u polimerima različitih molekulskih masa i omjerima kopolimera. *In vitro* oslobađanje pratilo se modificiranom dijalizacijskom metodom, pomoću 7 mL dijalizacijskih ćelija (Tube-O-Dialyzer, MWCO 300,000 Da). Oslobađanje olanzepina iz polimernog PLGA matriksa dešava se prvo difuzijom kroz matriks a potom i degradacijom polimera. Korišten je štakorski

model te je mikrosferni sustav osigurao produljeno oslobađanje olanzepina od 7 do 15 dana. Dekonvolucija je provedena Wagner Nelson i metodom za pojedine frakcije AUC-a. *In vitro* i *in vivo* profili oslobađanja pokazali su isti redoslijed oslobađanja te je postignuta korelacija A razine za sve ispitane formulacije olanzepina čime se potvrdila uspješnost razvijene metode dijalize, što je pokazano na Slici 15 (33).



Slika 15. Grafički prikaz vrijednosti IVIVC-a za PLGA mikrosferene formulacije olanzepina dobivene korištenjem Nelson-Wagner metode (kategorija A) prema (33).

Vrlo je teško pronaći jednu *in vitro* metodu koja bi se mogla koristiti za sve vrste parenteralnih pripravaka. *In vitro* oslobađanje indometacina iz biorazgardivih PLGA mikročestica praćeno je koristeći USP Aparaturu 2, inkubator s trešnjom, rotirajuće boce i USP Aparaturu 4. Oslobađanje lijeka bilo je najbrže kada se koristila protočna ćelija, dok su slični profili dobiveni korištenjem ostalih aparatura (34). Obzirom na nedostatak općenitih, i za sve proizvode primjenjivih metoda za praćenje oslobađanja iz terapeutskih sustava s produljenim oslobađanjem, *in vitro* metode bi se trebale razvijati nakon što se dobiju *in vivo* podaci. Tako bi se moglo optimirati parametre *in vitro* metode u svrhu oponašanja *in vivo* profila i slaganja s njima. Kada je oslobađanje iz određene formulacije opisano različitim fazama; svaka se pojedina faza odvojeno korelira (25).

3.15.IVIVC i parenteralne uljne (lipofilne) otopine

Uljne, lipofilne otopine već su desetljećima dostupne kao proizvodi za intramuskularnu i subkutanu primjenu te indikacije shizofrenije, hormonske terapije i kontrole plodnosti. Prednosti uljnih depo formulacija uključuju biokompatibilnost nosača formulacije, jednostavnu sterilnu proizvodnju, zadovoljavajuću fizikalnu i kemijsku stabilnost.

Tablica 4. Primjeri lipofilnih depo sustava za intramuskularnu primjenu dostupnih na tržištu.

Aktivna supstancija	**Proizvođač**	**Uljni nosač**
Estradiol valerate	Delestrogen® (Monarch Pharmaceuticals)	Ricinusovo ulje
Fluphenazine decanoate	Prolixin Decanoate® (Bristol-Myers Squibb)	Sezamovo ulje
Haloperidol decanoate	Haldol Decanoate® (Ortho-McNeil Pharmaceutical)	Sezamovo ulje
Testosterone cypionate	Depo-Testosterone® (Pharmacia and Upjohn)	Ulje sjemena pamuka
Zuclopenthixol acetate	Cisordinol-Acutard® (Lundbeck)	Frakcionirano kokosovo ulje
Fulvestrant	Faslodex® (AstraZeneca)	Ricinusovo ulje
Hydroxyprogesterone caproate	Makena® (AMAG Pharmaceuticals)	Ricinusovo ulje

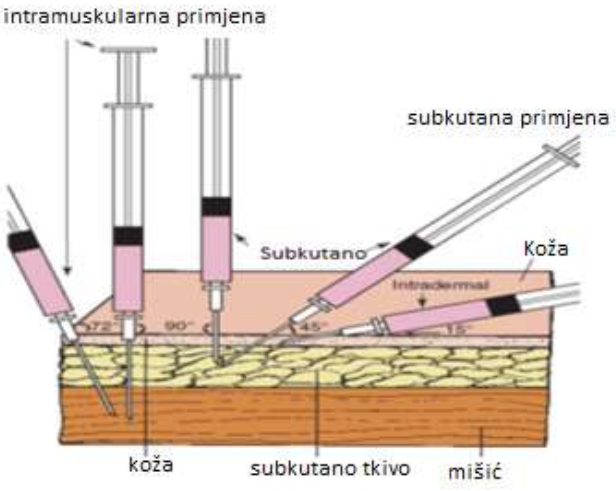
Upravo je odabir nosača, u većini slučajeva riječ je biljnim uljima, odgovoran za brzinu oslobađanja. Kao i kod drugih prirodnih produkata može se javiti varijabilnost između serija. Ponovljive karakteristike odabranog biljnog ulja moraju biti osigurane kroz odgovarajuće specifikacije. Treba istaknuti važnost načina i mjesta primjene parenteralne formulacije. Na oslobađanje lijeka iz parentarelnog pripravka dominantno utječu ili svojstva nosača (ili formiranog depoa) ili pak apsorpcija u krv ili limfu na mjestu primjene. Biološke karakteristike mjesta injektiranja mogu utjecati na apsorpciju lijeka. Brzina oslobađanja lijeka iz lipofilnih otopina je djelomično vezana uz razdiobu lijeka između uljnog nosača i tkivnih tekućina. Ostali faktori koji utječu na brzinu oslobađanja su oblik depoa na mjestu

injektiranja, te razgradnja samog nosača. (35). U Tablici 5. su navedeni faktori koji mogu imati utjecaj na mehanizam i brzinu oslobađanja iz parenteralnih uljnih depo formulacija.

Tablica 5. Faktori koji mogu imati utjecaj na mehanizam i brzinu oslobađanja.

Faktori	Mehanizam oslobađanja
Koeficijent razdiobe između uljnog nosača i tkivnih tekućina	Glavni faktor koji kontrolira oslobađanje (barem za umjereno lipofilne pripravke)
Širenje i dispergiranje lipofilne otopine na mjestu injektiranja	Može utjecati na brzinu oslobađanja promjenom kontaktne površine ulje/voda. Na razlike u dispergiranju može utjecati različiti volumen injektiranja, viskoznost ulja, mjesto i način primjene
Mjesto injektiranja	Fiziološke varijacije primjerice brzina protoka, dubina injektiranja mogu utjecati na brzinu i obim apsorpcije
Volumen injektiranja	Utječe na brzinu apsorpcije promjenom omjera površina-volumen uljnog nosača na mjestu primjene
Viskoznost uljnog nosača	Za sada nije pokazana povezanost s brzinom oslobađanja
Difuzija lijeka u uljni nosač	Potrebno razjasniti
Transport lijeka u tkivo procesima difuzije/konvekcije	Diktira stupanj uvjeta zadovoljene topljivosti
Razgradnja uljnog nosača na mjestu injektiranja	Potrebno razmatrati prvenstveno za visoko lipofilne lijekove
Hidroliza esterskog prolijeka na dodirnoj površini između uljnog nosača i tkiva	Moguće je da lipaze utječu na mehanizam oslobađanja

Na Slici 16. shematski je prikazana primjena parenteralne uljne formulacije pod različitim kutem i na različita mjesta (u mišić i pod kožu).



Slika 16. Shematski prikaz parenteralne primjene pod kutem u mišić i pod kožu (prilagođeno prema (7)).

Injektiranje pod kožu i u mišić međusobno se razlikuje obzirom na prokrvljenost, mogućnost širenja nosača te volumena ulja koji se može injektirati. Oslobađanje lijeka iz uljnih lipofilnih suspenzija uključuje razdiobu lijeka između uljnog nosača, tkivnog fluida te prelaska u krvotok tj. vodenu fazu. Primjeri korištene aparature za razvoj *in vitro* metoda oslobađanja uključuju tehnike dijalize, korištenje komercijalno dostupnih difuzijskih sustava tzv. *Float-a Lyzer*-a kao i kontinuiranog protoka. Larsen i suradnici pokazali su razvoj IVIVR modela formulacije lokalnog anestetika bupivakaina u viskooleo/ ricinusovom ulju 2:1 (v/v) koristeći rotirajuću dijalizacijsku ćeliju te 0,05 M fosfatni pufer pH 6,0. Obzirom da *in vitro* i *in vivo* oslobađanje bupivakaina slijedi kinetiku prvog reda ispitana je korelacija. Fiziološki podaci korišteni za IVIVR bili su koncentracije bupivakaina u plazmi nakon s.c. primjene kod štakora. (36)

3.16. IVIVC i parenteralne suspenzije

Suspenzije su disperzni sustavi u kojima su čestice fino dispergirane u tekućem mediju, obično vodenoj ili uljnoj fazi. Suspenzije su sustavi koji omogućuju korištenje visokog udjela

ljekovite supstancije uz minimalno korištenje pomoćnih supstancija. Veličina čestica za suspenzije ne prelazi 50 mikrona.

Za vodene suspenzije princip odgođenog oslobađanja može se opisati Noyes-Whitney jednadžbom koja opisuje brzinu otapanja čestica: $dC/dt = \frac{AD}{h}(Cs - C)$

Uvjeti osigurane topljivosti postižu se ako je razlika koncentracija (Cs - C) faktora iznad 0.7 gdje je Cs topljivost zasićene otopine ljekovite supstancije, dok je C koncentracija lijeka u receptorskom mediju. Malo se zna o mehanizmu oslobađanja lijeka iz uljnih suspenzija. Dva su moguća mehanizma oslobađanja; prvi koji pretpostavlja otpuštanje supstancije u uljni nosač prije razdiobe u vodenu fazu. Drugim mehanizmom se neotopljene čestice aktivne supstancije sedimentacijom razdjeljuju između faza ili direktno prelaze u vodeni medij gdje započinje otapanje. Važno je istaknuti da zadovoljavanje uvjeta topljivosti receptorskog medija utječe na *in vitro* profil brzine oslobađanja i korelaciju. Općenito, dobro formulirane suspenzije karakterizira lagano resuspendiranje čestica lijeka, dispergirane čestice se nakon mućkanja ne sliježu brzo, produkti resuspendiranja su homogene mješavine čestica lijeka. Za vrijeme roka valjanosti ne dolazi do stvaranja čvrstog kolača kojeg je teško resuspendirati. Suspenzije karakterizira stabilnost, sterilnost za vrijeme roka valjanosti. Literatura navodi da se *in vitro* oslobađanje iz suspenzija koje se primjenjuju u zglob prati korištenjem metoda dijalize (rotirajuća ćelija), dok se za suspenzije za subkutanu primjenu koristi tzv. agarozna gel metoda uzorkovanja i odjeljivanja (S-S metoda). Iako postoje pokušaji karakteriziranja, nema primjera uspostavljene korelacije.

3.17. IVIVC i parenteralni depo sustavi (*in situ* formirajući depo sustavi)

Komercijalno je dostupan *in situ* formirajući parenteralni depo sustav subkutane injekcije leuprolid acetata, Eligard®, Sanofi Aventis koji se koristi za liječenje uznapredovalog raka prostate, i dozira svakih jedan do šest mjeseci. Formiranje gel sustava korištenjem

termoosjetljivih polimera ili promjene faze kruto/tekuće na mjestu primjene, te oslobađanje i transport lijeka iz gel struktura primjerice hidrogelova se intenzivno proučava (37), (38). Kinetika prijelaza organskih otapala iz formulacija u tkivni odjeljak i brzina fazne inverzije uvelike utječe na karakteristike oslobađanja. Može rezultirati naglim početnim oslobađanjem ili njegovim izostankom i oslobađanjem kinetikom nultog reda. Brzina oslobađanja lijeka iz *in situ* formirajućih depo sustava je ograničavajući faktor koji dirigira brzinu apsorpcije. Mehanizam oslobađanja *in vivo* i *in vitro* je isti, te je većina relacija između pojedinih točaka *in vitro* i *in vivo* oslobađanja linearna. Idealno bi bilo razviti jedan model korelacije ukupnog plazma profila. Za praćenje brzine oslobađanja aktivne supstancije iz fazno osjetljive formulacije leuprolid acetata koristile su se 15 ml-ske posude termostatirane na 37°C u vodenoj kupelji uz potresanje. Oslobađanje je bilo brže iz formulacije koja je imala više hidrofilne frakcije (benzilnog alkohola) (39).

3.18. Europski regulatorni zahtjevi za farmakokinetsku i kliničku evaluaciju terapijskih sustava s modificiranim oslobađanjem

Novi europski vodič definira kliničke studije iz kojih se dobivaju podaci o učinkovitosti, sigurnosti, biofarmaceutskim i farmakokinetskim svojstvima dozirnih ljekovitih oblika s produljenim oslobađanjem s oralnim, intramuskularnim, subkutanim i transdermalnim putem primjene. Također, definira osnovne principe dizajna, provođenja, i evaluacije svake od provedenih studija, te daje smjernice za evaluaciju farmakokinetskih i kliničkih podataka terapijskih sustava za kontrolirano oslobađanje. Općenite preporuke za lijekove s trenutnim oslobađanjem (eng. *Immediate release* IR) (CPMP/EWP/QWP1401/98) vrijede i za pripravke s produljenim oslobađanjem (1):

- Ako se dva proizvoda istog dozirnog oblika razlikuju u mehanizmu oslobađanja ili pomoćnim supstancijama koje kontroliraju mehanizme oslobađanja mogu se smatrati

generičkim proizvodima ako su bioekvivalentni *in vivo* nakon doziranja jedne ili više doza u uvjetima gladi i hrane.

- Općenito se preporuča da se studije provode na zdravim dobrovoljcima. Ako, zbog sigurnosnih razloga nije moguće provoditi studije na dobrovoljcima, studije se mogu provoditi na pacijentima, preferirano nakon jedne i višestruke primjene doze. Ako nije moguće sprovesti jedno doziranje na pacijentima provodi se višestruko doziranje.
- Regulatorni zahtjevi spomenuti u vodiču primjenjivi su za bioekvivalencijske studije proizvoda koji kombiniraju karakteristike IR i MR proizvoda (npr. bifazno-pulsno oslobađanje).

Europski vodič razdvaja terapijske sustave s modificiranim, promijenjenim oslobađanjem na sustave s produljenim, odgođenim i višefaznim oslobađanjem aktivnih farmaceutskih supstancija, intramuskularne/subkutane depo formulacije te transdermalne terapijske sustave za dostavu lijeka. Farmakokinetske studije provode se kako bi se okarakterizirali sustavi za prilagođeno oslobađanje *in vivo* kroz studije brzine i količine apsorbirane ljekovite supstancije, studije promjena u koncentraciji lijeka u stanju dinamičke ravnoteže, varijabilnost farmakokinetskih parametara za određenu formulaciju između subjekata, proporcionalnost doza, faktori koji utječu na djelovanje formulacija s prilagođenim produlje, rizik neočekivanih karakteristika oslobađanja. Za intramuskularne i supkutane depo formulacije, za studije s jednokratnim doziranjem, ista se odabire na osnovu linearnosti farmakokinetskih parametara i sigurnosti (moguće je breketiranje). Za višekratno doziranje, ako se različite doze postižu odabirom ukupnog volumena, prihvatljivo je ispitati bilo koju dozu u slučaju da je pokazana proporcionalnost za referentni proizvod. Osnovni farmakokinetski parametri koji moraju biti zadovoljeni kod farmaceutskih pripravaka s prilagođenim oslobađanjem su C_{max}, C_{min}, AUC_t, $AUC_{(0-\infty)}$ te rani djelomični $AUC_{0\ -\ cut\text{-}off}$ i kasni terminalni djelomični $AUC_{cut\text{-}off\text{-}\ tlast}$ (u slučajevima kada se ne provode studije dinamičke ravnoteže (*steady state*). *Cut-off* vrijeme

obično predstavlja pola doziranog interval, ili neko drugo vrijeme za koje postoji znanstveno obrazloženje. Općenito potrebno je provoditi i terapeutske studije kojima se uspoređuje klinička efikasnost i sigurnost nove formulacije s modificiranim oslobađanjem.

Europski vodič preporuča da se, općenito za dozirne oblike s modificiranim oslobađanjem, koristi individualni pristup za svaku studiju pojedinačno. Tako se uzimaju u obzir intrinzična svojstva aktivne supstancije, populacija i indikacija odnosno namjena, put primjene, tip sustava za dostavu lijeka na mjesto djelovanja. Za pravilnu interpretaciju postojećih vodiča i budućih općih i specifičnih vodiča za određeni proizvod preporuča se savjetovanje s generalnim regulatornim tijelom *Scientific Advice* (1).

3.19. Američki regulatorni zahtjevi za farmakokinetsku i kliničku evaluaciju terapijskih sustava s modificiranim oslobađanjem

Relacija *in vitro in vivo* (IVIVR) nije robusna kao korelacija IVIVC, ali može biti važna za razvoj prema principima kvalitete ugrađene u dizajn (QbD), predviđanju djelovanja komercijalnih serija, promjenama nakon odobrenja. Za korelacijski model koji je važan za odobravanje novog inovativnog lijeka, preporuča se da farmaceutske kompanije pokažu korelaciju *in vitro i in vivo* oslobađanja za vrijeme razvoja novog lijeka. IVIVC treba biti unaprijed planiran što osigurava korištenje robusne/odgovarajuće analize podataka i povećava izgled za uspješnu korelaciju. Nakon odobrenja, IVIVC se koristi prilikom proizvodnih promjena prije i nakon odobrenja. IVIVC je iznad f_2 testa. Profili oslobađanja lijeka prije i nakon promjene koriste se za predviđanje C_{max} i AUC kako bi se utvrdila prihvatljivost. Osigurana je klinička važnost za uzorke čiji se profili oslobađanja lijeka, prije i nakon promjene nalaze unutar graničnih vrijednosti bioekvivalentnih serija (40). Opće *in vivo* smjernice naglašavaju da je za regulatorne potrebe nužno imati podatke na ljudima. Broj subjekata treba biti dovoljan da opiše biološko djelovanje lijeka. Nema ograničenja po pitanju dizajna studije, obično su u pitanju bioekvivalencijske studije u uvjetima gladi. Preferira se

crossover, paralelni dizajn te usporedbe između više studija. Koriste se i podaci za referentni tretman koji uključuju oralnu otopinu, intravensku otopinu, proizvod s trenutnim produlje. Za dekonvoluciju plazma profila, u svrhu dobivanja frakcije apsorbiranog lijeka za odgovarajuću formulaciju, koriste se Wagner Nelson, Loo-Riegelman, te numeričke dekonvolucijske metode. Opće *in vitro* smjernice ukazuju da je moguće koristiti bilo koju *in vitro* metodu oslobađanja. Jednom definiranu *in vitro* metodu treba koristiti za sve formulacije koje se ispituju. Koeficijent varijacije (%CV) za srednju vrijednost „*dissolution-a"* jedne serije mora biti manji od 10%. Američka regulativa za potrebe IVIVC-a preporuča kombinaciju od najmanje tri ili više formulacija koje se međusobno adekvatno razlikuju u brzini oslobađanja. *In vitro* metoda treba biti diskriminatorna i razlikovati takve formulacije. *Biowaiver* se može tražiti za promjene mjesta proizvodnje, proizvodne opreme, metoda i procesa, zatim promjene dobavljača sirovina i formulacijske promjene. IVIVC se ne može koristiti za odobrenje nove formulacije već odobrenog lijeka koja pokazuje razlike u mehanizmu oslobađanja, nove doze koja je izvan raspona dozi ispitanih u kliničkim studijama, kao ni za odobrenje novog proizvoda koji ima isti mehanizam kontrole oslobađanja kao već odobreni lijek. IVIVC se koristi prilikom postavljanja „*dissolution*" specifikacija za što nije potrebna eksterna validacija. Specifikacijske granice se mogu širiti na osnovu korelacijskih predviđanja. Specifikacija za koje se koristi korelacija C kategorije dozvoljava maksimalnu razliku od 20% u srednjim predviđenim vrijednostima C_{max} ili AUC-a (40).

4. Rasprava

Razvoj parenteralnih terapijskih sustava za modificirano prvenstveno produljeno/ kontrolirano oslobađanje ljekovitih supstancija treba predstavljati međusobnu ovisnost *in vivo* i *in vitro* karakteristika gotovog proizvoda. Razvoj *in vitro* metoda oslobađanja ljekovite supstancije povezan je se s formulacijskim razvojem i promjenama u sastavu formulacije koje mogu imati utjecaja na brzinu oslobađanja lijeka, korelacijom *in vitro* oslobađanja i *in vivo* apsorpcije, shodno tome i smanjenjem broja bioekvivalencijskih studija, kontrolom kvalitete i konzistencijom proizvodnih serija (eng. *batch release*). *In vitro* studije oslobađanja iz terapijskih sustava s modificiranim oslobađanjem provode se kako bi se zadovoljili neki od navedenih ciljeva: (4)

- Kao indirektna mjera raspoloživosti lijeka, posebice u preliminarnoj fazi formulacijskog razvoja.
- Test kontrole kvalitete koji služi za potvrdu o prikladnosti određene serije za puštanje na tržište te za provjeru podudarnosti sa specifikacijskim granicama serija za koje je pokazan klinički i biološki učinak.
- Za razumijevanje formulacijskih faktora i proizvodnih procesa koji mogu utjecati na bioraspoloživost.
- Kao regulatorni zahtjev.

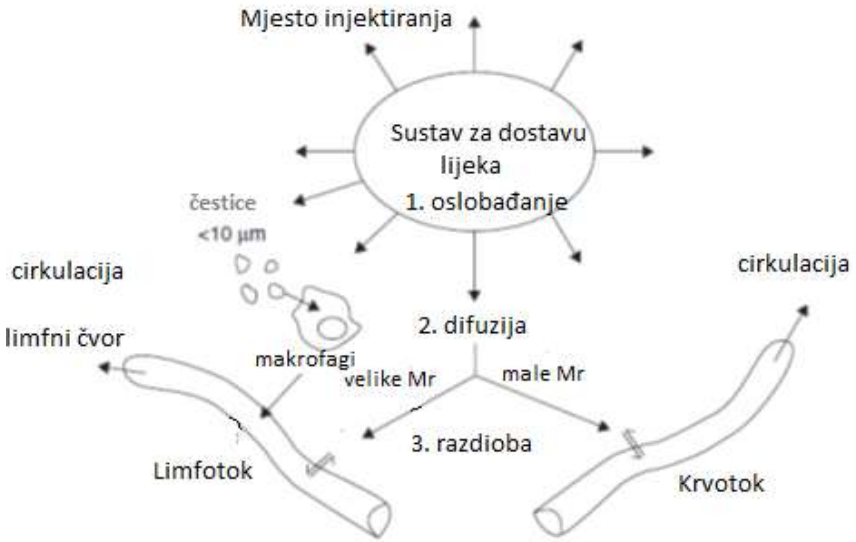
Trenutno važeća regulativa ne sadrži standardne metode za praćenje brzine oslobađanja ljekovite supstancije iz parenteralnih pripravaka modificiranim oslobađanjem. *In vitro* metode oslobađanja općenito se mogu podijeliti na metode uzorkovanja i odjeljivanja, metode kontinuiranog protoka i metode dijalize od kojih svaka ima prednosti i nedostatke. Paralelno, s razvojem novih i složenijih sustava za dostavu lijeka, razmišlja se o važnosti pouzdane *in vitro* metode koja pomaže u ostvarenju krajnjeg cilja a to je osiguravanje kliničkog

djelovanja, sigurnost i učinkovitost. Poboljšanja u razvoju *in vitro* metoda oslobađanja idu u smjeru jačanja interdisciplinarne suradnje, testiranja u ubrzanim uvjetima i usporedbe s rezultatima dobivenim u stvarnom vremenu, što rezultira boljom predikcijom. Za to je nužno razumijevanje složenosti fizioloških procesa oslobađanja i transporta *in vivo* i fiziologije okoliša različitih mjesta injektiranja parenteralnih pripravaka. Obzirom na složenost fizioloških uvjeta kojima su izloženi parenteralni sustavi s produljenim oslobađanjem, vrlo ih je zahtjevno u potpunosti simulirati *in vitro*. Općenito je razvoj modela korelacije *in vitro-in vivo* za parenteralne pripravke složeniji u odnosu na IVIVC za oralne dozirne oblike. U proteklih dvadesetak godina najviše su se razvijali korelacijski modeli za polimerne mikrosferne/implantne sustave i uljne depo formulacije. Prema pretraženoj literaturi može se zaključiti da je samo nekoliko uspješno razvijenih i validiranih modela kojima je pokazana korelacija *in vitro* i *in vivo* oslobađanja za parenteralne mikrosferne sustave. Za uspješnu predikciju i razvoj IVIVC-a u smislu oslobađanja i procesa transporta *in vivo* potrebno je poznavanje mehanizma oslobađanja lijeka iz parenteralnog pripravka. Transport masa u mekanom tkivu intersticijske tekućine obično se opisuje omjerom transporta između konvekcije i difuzije. Tu je i potreba za boljim poznavanjem domaćinskog odgovora primjerice kod primjene i stvaranja depoa. Većina službenih metoda za praćenje brzine oslobađanja koristi uvjete zadovoljene topljivosti, ali se postavlja pitanje postoje li takvi uvjeti u organizmu. Treba voditi računa i da li je razvijen model za odgovarajuću indikaciju, da li je farmakokinetika ista za stanje bolesti i zdravlja. S fiziološkog stanovišta to znači osiguravanje uvjeta kakvi postoje *in vivo* na mjestu djelovanja, tjelesnu temperaturu i metabolizam, faktori koji utječu na protok krvi, pH, kapacitet pufera, prokrvljenost, volumen i osmolalnost proizvoda kao i tkivni odgovor. Između ostalih, riječ je o fiziološki prisutnim hidrolitičkim enzimima, učinku proteina na razgradnju polimera, pH gradijentu, imunološkom odgovoru organizma. Osnovni fiziološki principi odgovorni za *in vivo* djelovanje lijeka su isti bez

obzira da li je riječ o čovjeku ili životinjskom modelu. Ono što se razlikuje je veza između fizioloških atributa i interakcije s formulacijom. Tako je primjerice intersticij složena mješavina iona, lipida, proteina, ugljikohidrata, te je difuzija lijeka ovisna o veličini, naboju, hidrofilnosti, interakciji s endogenim komponentama intersticijske tekućine. Jednostavne formulacijske promjene u koncentraciji lijeka, volumenu injektiranja, ionskoj jakosti, viskoznosti ili pH mogu utjecati na promjenu brzine difuzije s mjesta primjene. *In vitro* metode za praćenje brzine oslobađanja ljekovite supstancije koriste se kako za potrebe formulacijskog razvoja tako i za potrebe kontrole kvalitete proizvoda. Zadovoljavanje specifikacijskih granica za određeni proizvod *in vivo* se može razlikovati kada se evaluira iz perspektive zdravih pojedinaca i pacijenata. Pritom se treba uzeti u obzir da se određeni fiziološki procesi primjerice opsonizacija liposoma ili eliminacija mikročestica fagocitozom mogu razlikovati kod zdravih dobrovoljaca i pacijenata ili različitih životinjskih vrsta.

Bez obzira na kompleksnost i složenost fiziologije ljudi, biraju se jednostavni *in vitro* modeli koji se mogu svakodnevno koristiti u farmaceutskom razvoju, kao i za potrebe kontrole kvalitete proizvoda. Prema dosada dostupnoj literaturi vjerojatnost za uspostavljanje korelacije veća je kada *in vitro* metoda oslobađanja osigurava topljivost, što nužno ne mora biti pri fiziološkom pH. Nedostatak informacija i nedovoljno relevantnih fizioloških podataka rezultira povećanim oprezom kod uspostavljanja regulatornih granica. Važan je i odabir najprimjerenijeg animalnog modela za predkliničke studije. Animalne studije i razvoj korelacije korištenjem animalnih *in vivo* podataka zauzimaju važno mjesto u odabiru optimalne parenteralne formulacije.

Na Slici 17. shematski je prikazana sva složenost mogućih putova apsorpcije lijeka iz parenteralnih formulacija koji se primjenjuje intramuskularno ili subkutano.



Slika 17. Shematski prikaz putova apsorpcije lijeka iz pareneralnog proizvoda (prilagođeno prema (9)).

Individualne razlike o kojima treba promišljati uključuju protok krvi, efekt širenja, veličinu doze, kozmetičke različitosti. *In vitro* profil oslobađanja daje informacije o strukturi (npr. poroznosti) i ponašanju ljekovite supstancije u formulaciji odnosno sustavu za dostavu na molekularnoj razini, moguće interakcije lijeka i polimera, i njihov utjecaj na brzinu i mehanizam oslobađanja lijeka. Literaturno dostupna znanja olakšavaju znanstveni pristup dizajnu i razvoju parenteralnih sustava s modoficiranim oslobađanjem. Ipak, činjenica je da se mali broj znanstvenika bavi paralelno i razvojem *in vitro* metoda za praćenje brzine oslobađanja. U zadnjih desetak godina intenzivira se razvoj *in vitro* modela za praćenje oslobađanja iz biorazgradivih polimernih mikrosfera (20), (18).

Razvoj korelacije za parenteralne sustave s modificiranim oslobađanjem, trebao bi početi nakon prikupljanja dovoljno relevantnih *in vivo* podataka. Takvi podaci koriste se za razvoj *in vitro* metode koja može predvidjeti *in vivo* oslobađanje. Dobar IVIVC model može voditi formulacijski i procesni razvoj, promjene u različitim fazama, te pomoći u postavljanju klinički relevantnih specifikacijskih granica. Postavljanje specifikacija za *in vitro* testove

oslobađanja relevantno je samo u slučaju da se točno odrede faktori koji određuju *in vivo* oslobađanje lijeka a izazovi mogu biti:

- Za mikrosfere gubitak konformacije za vrijeme proizvodnog procesa što može dovesti do različitih reakcija na mjestu injektiranja.
- Za nanočestice problemi vezani za precizna mjerenja veličine čestica, agregacija i aglomeracija.
- Za liposome problemi sa stabilnošću sustava i postizanje željene koncentracije lijeka.
- Za biorazgradive polimerne implante gubitak konformacije i postizanje željene koncentracije lijeka.
- Za *in situ* formirajuće gelove dobra kontrola dostave ljekovitih supstancija (primjerice peptida i proteina). Formiranje gela i oslobađanje lijeka mogu biti podložni utjecaju fizioloških parametara. Izazove predstavlja kontrola naglog početnog oslobađanja.

Najvažnije je svakako da, ako se uspostavi i potvrdi korelacija A kategorije, može koristiti kao zamjena za bioekvivalencijske studije. Unatoč višegodišnjim naporima vrlo je mali broj prijavljene registracijske dokumentacije koje imaju IVIVC za oralne lijekove s modificiranim oslobađanjem, a pogotovo za parenteralne ljekovite pripravke. Razloge treba tražiti, kako u složenosti samih modificiranim formulacija i sustava za oslobađanje, tako i u nepostojanju standardizirane aparature i metodologije *in vitro*. Posljednjih se godina intenzivira suradnja akademske zajednice, industrije i regulative u svrhu objedinjavanja znanja i razvoja prikladnih *in vitro* metoda. U svrhu potvrđivanja mehanizma oslobađanja lijeka koriste se različiti matematički modeli (Higuchi, Weibull) koji pretpostavljaju da nema oslobađanja u početnom vremenu te da je u određenom vremenu oslobađanje potpuno. Uvođenjem parametra koji predstavlja određeni stupanj oslobođenog lijeka modeli se mogu koristiti za nekompletne profile oslobađanja. Izazov u uspostavljanju IVIVC-a predstavlja i dekonvolucija *in vivo* podataka i korelaciju s vrijednostima *in vitro* oslobađanja obzirom na

složenost i oslobađanje koje slijedi kinetiku u više faza. Obzirom na dugotrajno oslobađanje iz kompleksnih parenteralnih formulacija s modificiranim oslobađanjem, naglašava se važnost ubrzanih metoda za koje bi bilo idealno da u konačnici odgovara mehanizmu oslobađanja u realnom vremenu. Navedeno je ponekad teško postići jer se pod utjecajem ubrzanih parametara (povišene temperature, promjene pH) mehanizam oslobađanja mijenja. Ubrzane *in vitro* metode oslobađanja mogu se koristiti u regulatorne svrhe ako promjene parametara jednako utječu na različite ispitivane formulacije te se zadrži diskriminatornost metode. Pregledom literature vidljivo je da bi daljnji napori za, primjerice mikrosferne sustave, trebali biti usmjereni na razvoj metoda koje bi se mogle primjenjivati na većem broju molekula s razlikom u fizikalno kemijskim karakteristikama i polimernim matriksima. Profesor Larssen imajući na umu proizvode 3 generacije (tzv. modularni sustavi gdje se integrirano promatra lijek i sustav za dostavu na mjesto djelovanja) naglašava da bi se razvoju odgovarajućeg *in vitro* modela trebalo pristupiti u tri koraka: prvi, kojim se definira metoda osjetljiva da razluči „dobre“ od „loših“ formulacija, drugi, kojim se utvrđuje korelacija na jednostavnom animalnom modelu i treći, koji uspostavlja korelaciju na modelu osjetljivom na promjene farmakokinetike lijeka koje nastaju kao posljedica bolesti. U novije vrijeme sve su izraženija nastojanja i zahtjevi farmaceutske industrije i regulatornih tijela za sistematizirani razvoj prema principima kvalitete ugrađene u dizajn (eng. *Quality by Design*, QbD). Kvaliteta se definira kao prikladnost ljekovite supstancije ili proizvoda za ciljanu namjenu. Kvaliteta ugrađena u dizajn podrazumijeva sistematičan pristup razvoju koji počinje definiranim ciljevima i stavlja naglasak na razumijevanje proizvoda te razumijevanje i kontrolu procesa, a temeljen je na znanstvenim dokazima i procjeni rizika kvalitete (41). Prednosti QbD-a prepoznala je i američka regulativa koja izrazito potiče njegovo korištenje (42).

5. Zaključak

In vitro metode za praćenje oslobađanja ljekovitih supstancija iz parenteralnih terapijskih sustava s modificiranim oslobađanjem, razvijaju se u svrhu praćenja kvalitete proizvoda kroz faze razvoja formulacije i proizvodnje, te razumijevanja i povezivanja *in vitro* i *in vivo* mehanizama oslobađanja. Ključni faktori formulacijskog razvoja parenteralnih pripravaka s modificiranim oslobađanjem djelatne tvari su praćenje *in vitro* brzine oslobađanja, *in vitro in vivo* korelacija, stabilnost za vrijeme proizvodnje i roka valjanosti, *in vivo* stabilnost, sterilnost, veličina čestica, bioraspoloživost, potvrda bioekvivalentnosti, kvalifikacija polimera, količina ostatnih otapala i rekonstitucija. Razvoj *in vitro* metoda oslobađanja uključuje odabir aparature, medija, uzorkovanja, vremena testiranja, količinu oslobođene supstancije. Evropska i američka farmakopeja ne sadrže standardne *in vitro* metode za oslobađanje iz parenteralnih pripravaka s modificiranim oslobađanjem (4). Razvoj modela *in vitro in vivo* korelacije je složen, ne samo zbog kompleksnosti formulacija (primjerice oslobađanje lijeka u više faza), već i zbog nedostatka odgovarajućih *in vitro* metoda. U proteklih dvadesetak godina najviše su se razvijali korelacijski modeli za polimerne mikrosferne/implantne sustave. Samo je nekoliko uspješno razvijenih i validiranih modela za parenteralne pripravke s modificiranim oslobađanjem, prvenstveno mikrosferne sustave za dostavu lijeka, dok se većina dostupne literature svodi na razvojne tzv. *proof of concept* studije koje samo nagovještaju mogućnost korelacije. Za uspješan razvoj *in vitro* metoda potrebno je objediniti znanja o aktivnoj supstanciji, gotovom proizvodu i sustavu koji dirigira oslobađanje, fiziologiji mjesta primjene u organizmu, te se, što je moguće više, približiti *in vivo* oslobađanju i apsorpciji lijeka.

6. Literatura

1.http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2014/11/WC500177884.pdf. [Online] [Cited: Siječanj 10, 2017.]

2. Food and Drug Administration (FDA) Extended release oral dosage forms: development, evaluation and application of in vitro/in vivo correlations 1997. Dostupno na http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm0702. [Online] [Cited: Prosinac 16, 2016.]

3. Burgess DJ, Wright CJ. An Introduction to Long Acting Injections and Implants. U: Wright CJ, Burgess DJ, ur. Long acting injections and implants. CRS Press Springer;2012, str. 475-504.

4. *Mitra A, Wu Y. Use of In Vitro-In Vivo Correlation (IVIVC) to facilitate the development of polymer-based controlled release injectable formulation. Recent Pat Drug Deliv Formul 2010;4(2):94-104.*

5. *Xu J. Development of the Sustained Release Analgesic Formulations for Rodents and a Novel In Vito Model for Parenteral Formulations with the Character of a Level a IVIVC 2012. dostupno na http://dc.uthsc.edu/dissertations/.pdf.*

6. *Shen J, Burgess DJ. In vitro-in vivo correlation for complex non-oral drug products: Where do we stand? J Control Release 2015;219:644-651.*

7. Kastellorizios M, Burgess DJ. In vitro Drug Release Testing and In Vivo/In Vitro Correlation for Long Acting Implants and Injections. U Wright JC, Burgess DJ. ur. Long acting injections and implants. CRS Press Springer;2012, str.475-504.

8. *Wright JC, Hoffman AS. Historical Overview of Long Acting Injections and Implants. U: Wright JC, Burgess DJ. ur.Long Acting Injections and Implants. CRS Press Springer;2012, str.11-22.*

9. *Park K. Controlled drug delivery systems: Past forward and future back. JCR2014;190:3–8.*

10. *Qiang N, Wurong C, Lei T, Jue C,Chao J.Preparation of novel biodegradable ropivacaine microspheres and evaluation of their efficacy in sciatic nerve block in mice.Drug Des Devel Ther 2016;10:2499–2506.*

11. *Malinowski HJ. The role of in vitro-in vivo correlations (IVIVC) to regulatory agencies. Adv Exp Med Biol 1997;423:261–268.*

12. *Phillips DJ, Pygallb SR, Brett V, Mann JC. Overcoming sink limitations in dissolution testing: a review of traditional methods and the potential utility of biphasic systems. J Pharm and Pharmacology 2012;64:1549–1559.*

13. *Collier JW, Thakare M, Garner ST, Israel B, Ahmed H, Granade S, Strong DL, Price JC, Capomacchia AC. Accelerated dissolution testing for controlled release microspheres using the fl ow-through dissolution apparatus. Pharm Dev Technol 2009;14(1):9–17.*

14. *D'Souza SS, Faraj JA, DeLuca PP. A model-dependent approach to correlate accelerated with real-time release from biodegradable microspheres. AAPS PharmSciTech 2005;6(4):553–564.*

15. http://www.sotax.com/products/dissolution-testing/usp-4/. [Online] Prosinac 15, 2016.

16. *Zolnik BS, Burgess DJ. Evaluation of in vivo-in vitro release of dexamethasone from PLGA microspheres. J Control Release 2008;127(2):137–145.*

17. *Schultz K, Mollgaard B, Frokjaer S, Larsen C. Rotating dialysis cell as in vitro releasemethod for oily parenteral depot solutions. Int J Pharm 1997;157(2):163–169.*

18. *Chidambaram N, Burgess DJ. A novel in vitro release method for submicron sized dispersed systems. AAPS PharmSci 1999;1(3):E11.*

19. *Siewert M, Dressman J, Brown C, Shah VP. FIP/AAPS guidelines for dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms. Dissolution Technol 2003;10:6-15.*

20. *Bhardwaj U, Burgess DJ. A novel USP apparatus 4 based release testing method for dispersed systems. Int J Pharm 2010;388(1–2):287–294.*

21. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug FDA-Recommended Dissolution Methods, http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/. [Online] [Cited: Studeni 20, 2016.]

22. *Moore J, Flanner HH. Mathematical comparison of dissolution profiles. Pharm Tech 1996; 20:64–74.*

23. http://search.proquest.com/docview/1271756111. *Development of the Sustained Release Analgesic Formulations for Rodents and a Novel In Vitro Model for Parenteral Formulations with the Character of a Level A IVIVC.* [Online] [Cited: Ožujak 2, 2016.]

24. *Chu DF, Fu XQ, Liu WH, Liu K, Li YX. Pharmacokinetics and in vitro and in vivo correlation of huperzine A loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres in dogs. Int J Pharm 2006; 325(1–2):116–123.*

25. *D'Souza SS, DeLuca PP. Methods to Assess in Vitro Drug Release from Injectable Polymeric Particulate Systems, Pharm Res 2006;23(3):460-474.*

26. http://www.fda.gov/ForIndustry/UserFees/GenericDrugUserFees/ucm512491.htm. [Online] [Cited: Listopad 10, 2016.]

27. *Rawat A, Stippler E, Shah VP, Burgess DJ.Validation of USP apparatus 4 method for microsphere in vitro release testing using Risperdal Consta.Int J Pharm 2011;420(2):198-205.*

28. *Rawat A, Bhardwaj U, Burgess DJ. Comparison of in vitro-in vivo release of Risperdal(®) Consta(®) microspheres.Int J Pharm 2012;434(1-2):115-21.*

29. *Shen J, Choi S, Qu Z, Wang Y, Burgess DJ. In vitro-in vivo correlation of parenteral risperidone polymeric microspheres.J Control Release. 2015;218:2-12.*

30. *Negrin CM, Delgado A, Llabres M, Evora C. In vivo in vitro study of biodegradable methadone delivery systems. Biomaterials 2001;22(6):563-570.*

31. *Kostanski JW, Thanoo BC, DeLuca PP. Preparation, characterization, and in vitro evaluation of 1- and 4-month controlled release orntide PLA and PLGA microspheres. Pharm Dev Technol 2000;5(4):585-96.*

32. *Jiang G, Woo BH, Kang F, Singh J, DeLuca PP. Assessment of protein release kinetics, stability and protein polymer interaction of lysozyme encapsulated poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. J Control Release2002;79(1-3):137-45.*

33. *D'Souza SS, Faraj JA, Giovagnoli S, DeLuca P. IVIVC from Long Acting Olanzapine Microspheres. Int J Biomater 2014;1-11.*

34. *Conti B, Genta I, Giunchedi P, Modena T. Testing ofi n vitro dissolution behaviour of microparticulate drug delivery systems. Drug Dev. Ind. Pharm 1995;21:1223-1233.*

35. *Larsen SW, Larsen C. Critical Factors Influencing the In Vivo Performance of Long-acting Lipophilic Solutions—Impact on In Vitro Release Method Design. AAPS J 2009;11(4):762–770.*

36. *Larsen DB, Joergensen S, Olsen NV, Hansen SH, Larsen C. In vivo release of bupivacaine from subcutaneously administered oily solution. Comparison with in vitro release. J Control Release 2002;17:81(1-2):145-54.*

37. *Kumbhar AB, Rakde AK, Chaudhari PD. IJPSR, 2013; Vol. 4(2): 597-609.*

38. *Osmani R. et al., In-situ Forming Parenteral Drug Delivery: A Newfangled Loom In Therapeutics. American Journal of Pharmacy & Health Research 2014.*

39. *Singh S, Singh J. Phase-sensitive polymer-based controlled delivery systems of leuprolide acetate: in vitro release, biocompatibility, and in vivo absorption in rabbits. Int J Pharm 2007;328(1):42-8.*

40.http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070239.pdf. [Online] [Cited: Listopad 1, 2016.]

41.http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002872.pdf. [Online] [Cited: Listopad 20, 2016.]

42.http://www.fda.gov/downloads/drugs/developmentapprovalprocess/howdrugsaredevelopedandapproved/approvalapplications/abbreviatednewdrugapplicationandagenerics/ucm286595.pdf. [Online] [Cited: Listopad 1, 2016.]