



**EZETİMİBİN FİZYOLOJİK TEMELLİ FARMAKOKİNETİK
MODELLEMESİNE VE İN VİTRO İN VİVO DEĞERLENDİRMELERİNE
YÖNELİK ÇALIŞMALAR**

Çiğdem BAYKA

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
ENDÜSTRİYEL ECZACILIK YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2015

Çiğdem BAYKA tarafından hazırlanan “Ezetimibin Fizyolojik Temelli Farmakokinetik Modellemesine ve İn Vitro İn Vivo Değerlendirmelerine Yönelik Çalışmalar” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Endüstriyel Eczacılık Yüksek Lisans Programı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN

Farmasötik Teknoloji, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Başkan: Prof. Dr. Nevin ÇELEBİ

Farmasötik Teknoloji, Gazi Üniversitesi

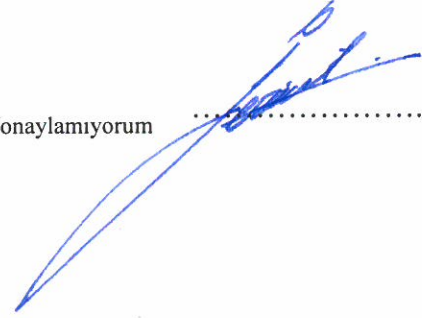
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Üye: Prof. Dr. Ercüment KARASULU

Farmasötik Teknoloji, Ege Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Tez Savunma Tarihi: 19/01/2015

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Doç. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Çiğdem BAYKA

19.01.2015

EZETİMİBİN FİZYOLOJİK TEMELLİ FARMAKOKİNETİK
MODELLEMESİNE VE İN VİTRO İN VİVO DEĞERLENDİRMELERİNE

YÖNELİK ÇALIŞMALAR

(Yüksek Lisans Tezi)

Çiğdem BAYKA

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2015

ÖZET

Son yıllarda, ilaçların in vivo davranışının belirlenmesinde, in vivo çalışmalar yanında BCS temelli biyofarmasötik değerlendirmeler, in siliko yaklaşımlar, farmakokinetik modellemeler kullanılarak yapılan simülasyonlar ve in vitro in vivo korelasyon (IVIVC) değerlendirmeleri önem kazanmıştır. Ezetimib, düşük çözünürlük ve yüksek permeabilite özelliği gösteren BCS Sınıf 2'ye ait bir etkin maddedir. Ezetimib, ilk geçiş etkisine maruz kalan, enterohepatik sirkülasyona giren bir molekül olup metabolizma ve taşıyıcı kinetiği açısından oldukça karmaşıktır. Bu çalışmada, biyoeşdeğerliği gösterilmiş bir ürün olan Ezetimib 10 mg tablet için klasik ve biyoyumlu çözünme ortamlarından elde edilen veriler kullanılarak IVIVC değerlendirmelerinin yapılması ve farklı in vitro çözünme ortamlarının korelasyona olan etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu kapsamda, in vitro ve in siliko çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ezetimib molekülü için GastroPlus™ programının birçok özelliği kullanılarak fizyolojik temelli farmakokinetik modelleme yaklaşımıyla enterohepatik sirkülasyonu içeren bir farmakokinetik model oluşturulmuştur. Oluşturulan modelde, ortalama plazma konsantrasyon eğrisi simüle edilmiştir. Ancak, ezetimibin karmaşık metabolizma kinetiği ve yüksek değişkenlik özellikleri nedeniyle, bireyler için tek tek model oluşturulması ve taşıyıcı etkisinin de simülasyona eklenmesiyle modelin geliştirilmesinden sonra IVIVC değerlendirilmelerinin yapılabileceği sonucuna varılmıştır.

Bilim Kodu : 1020
Anahtar Kelimeler : Ezetimib, farmakokinetik modelleme, in vitro in vivo korelasyon, biyoyumlu çözünme ortamları, BCS, enterohepatik sirkülasyon
Sayfa Adedi : 154
Danışman : Doç. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN

PHYSIOLOGICALLY-BASED PHARMACOKINETIC MODELING AND IVIVC
EVALUATION OF EZETIMIBE

(M. Sc. Thesis)

Çiğdem BAYKA

GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

January 2015

ABSTRACT

Nowadays, BCS based biopharmaceutical assessments, in silico approaches, pharmacokinetic modeling and in vitro in vivo correlations have become surrogates to in vivo studies in order to evaluate the in vivo behavior of drugs. Ezetimibe is a BCS Class 2 drug with low solubility and high permeability. Ezetimibe is a very complicated molecule due to gut metabolism, first pass effect, enterohepatic recirculation, metabolism and transporter kinetics. In this study, the aim was to develop an IVIVC for a bioequivalent generic product, Ezetimibe 10 mg tablets by using in vitro dissolution data from classical and biorelevant dissolution media and to evaluate the effect of different in vitro dissolution media on IVIVC. In the frame of this thesis, in vitro and in silico studies were carried out. A physiologically based pharmacokinetic model which accounts for the enterohepatic recirculation of ezetimibe was developed by using different modules of GastroPlus™ and the mean plasma concentration vs time profile was simulated. Due to complex metabolism kinetics and high variation of ezetimibe, this model should be refined by fitting individual plasma concentration profiles and considering transporter effect before an IVIVC is developed.

ScienceCode : 1020

KeyWords : Ezetimibe, pharmacokinetic modeling, in vitro in vivo correlations, biorelevant dissolution media, BCS, enterohepatic circulation

Page Number : 154

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında bilgisi, desteği ve güler yüzüyle yanımda olan ve ihtiyacım olan her konuda benden yardımlarını esirgemeyen sevgili danışman hocam Doç. Dr. Zeynep Şafak Teksin'e,

Başta Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Teknolojisi Bölüm Başkanı Prof. Dr. Füsun Acartürk ve Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Nevin Çelebi olmak üzere tüm bölüm hocalarıma ve arkadaşlarıma,

Hiçbir talebimi geri çevirmeden çalışmalarım sırasında bana her konuda destek sağlayan “Zentiva Sağlık Ürünleri San. ve Tic. A.Ş.” Geliştirme Direktörü Dr. Mustafa Adıyaman, Formülasyon Geliştirme Yöneticisi Dr. Umut Oran ve Analitik Geliştirme Sorumlu Uzmanı Dr. Tayfun Oltulu'ya,

Çalışmalarım sırasında sağladıkları destek için “Zentiva Sağlık Ürünleri San. ve Tic. A.Ş.” Geliştirme Bölümü'ndeki çalışma arkadaşlarıma,

Benden yardım ve ilgilerini esirgemeyen sevgili dostlarım Tuğba Üney ve Üstün Özgür'e,

GastroPlus™ programının kullanımı konusunda bana yardımcı olan, bilgi ve tecrübelerini aktaran “Sanofi-Fransa” Biyofarmasi Bölümü Yöneticisi Dr. Xavier Pepin ve Simulations Plus firmasının kurucusu ve yöneticisi Dr. Michael Bolger'a,

Bana her zaman yardımcı olan babam Hakkı Bayka, annem Banu Bayka, anneannem Yüksek Okan, ağabeyim Arda Akman, teyzem Dr. Neslihan Gürbüz ve eşim Kaan Bayka'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1.Çözünürlük ve Çözünme Hızı.....	3
2.2.Mide-Bağırsak Kanalında Çözünme ve Çözünme Hızına Etki Eden Faktörler..	5
2.2.1. Mide-bağırsak kanalının fizyolojisi	6
2.2.2. Tampon kapasitesi.....	8
2.2.3. Yüzey etkin maddeler.....	8
2.2.4. Enzimler	8
2.2.5. Hacim	9
2.2.6. Mide-bağırsak kanalının hidrodinamik özellikleri.....	9
2.3.In Vitro Çözünme Hızı Testlerinin Kullanımı	10
2.3.1. In vitro çözünme ortamları.....	11
2.4.Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi (BCS).....	18
2.4.1. Temel BCS parametreleri.....	20
2.4.2. BCS'e göre in vitro çözünme ortamının seçimi	22

	Sayfa
2.4.3. BCS Alt Sınıflandırma	23
2.5. Bilgisayar Simülasyonlarıyla Farmasötik Değerlendirmeler	24
2.5.1. Giriş	24
2.5.2. Farmakokinetik modelleme	24
2.5.3. Klasik modeller	25
2.5.4. Fizyolojik temelli farmakokinetik modelleme (PBPK)	25
2.6. İn vitro in vivo korelasyon (IVIVC) geliştirilmesi	30
2.6.1. Korelasyon türleri	31
2.6.2. Korelasyon geliştirilmesi	32
2.6.3. Korelasyon değerlendirilmesi	34
2.6.4. GastroPlus™	38
2.6.5. ADMET Predictor™	50
2.7. Etkin Madde Özellikleri	64
2.7.1. Kimyasal özellikler	64
2.7.2. Görünüş ve erime özellikleri	64
2.7.3. Polimorfik özellikleri	64
2.7.4. Çözünürlük özellikleri	64
2.7.5. Miktar tayini yöntemleri	65
2.7.6. Farmakolojik özellikleri	65
2.7.7. Endikasyonları	65
2.7.8. Kullanım şekli ve dozu	66
2.7.9. Farmakokinetik özellikleri	66
2.7.10. Ergen ve pediatrik hastalarda kullanım	69
2.7.11. Geriatrik hastalarda kullanım	69
2.7.12. Farklı cinsiyet ve ırklarda kullanım	69

	Sayfa
2.7.13.Böbrek ve karaciğer hastalarında kullanım	69
2.7.14. Ezetimib için BCS Değerlendirmesi	69
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	71
3.1. Materyal	71
3.1.1. Kimyasal maddeler.....	71
3.1.2. Araç ve gereçler	72
3.2. Yöntem.....	73
3.2.1. In vitro çözünme ortamlarının hazırlanması	73
3.2.2. Ezetimib 10 mg tablet in vitro çözünme hızı metot validasyonu	73
3.2.3. Çözünürlük.....	77
3.2.4. In vitro çözünme hızı deneyleri.....	77
3.2.5. GastroPlus™'la yapılan simülasyon çalışmaları.....	79
4. BULGULAR	83
4.1. HPLC spektrumu.....	83
4.2. In vitro çözünme ortamlarındaki standart doğrulara ait bulgular	84
4.3. Doğruluk ve geri elde.....	87
4.4. Tekrarlanabilirlik.....	88
4.5. Özgünlük ve seçicilik.....	90
4.6. Kesinlik	94
4.7. Stabilitate	95
4.8. Çözünürlük.....	96
4.9. In vitro çözünme hızı çalışmaları.....	97
4.9.1. Ezetimib 10 mg Tablet (Pilot 02) için Klasik İn Vitro Çözünme Ortamlarında Gerçekleştirilen Çalışmalar	101

Sayfa

4.9.2. Ezetimib 10 mg Tablet (Pilot 02) için Biyouyumlu Ortamlarda Gerçekleştirilen Çalışmalar.....	103
4.9.3. Ezetrol 10 mg Tablet (Lot no: 301635) için Klasik İn Vitro Çözünme Ortamlarında Gerçekleştirilen Çalışmalar	104
4.9.4. Ezetrol 10 mg Tablet için Biyouyumlu Ortamlarda Gerçekleştirilen Çalışmalar	106
4.10. GastroPlus™'la Yapılan Simülasyon Çalışmaları	107
4.10.1.Molekül özellikleri sekmesi	107
4.10.2.Fizyolojik Özellikler	118
4.10.3.Farmakokinetik Özellikler.....	118
4.10.4.Simülasyon	123
5. TARTIŞMA	129
5.1.HPLC metot validasyonu	132
5.2.Çözünürlük.....	133
5.3. İn vitro çözünme hızı	133
5.4. İn siliko çalışmalar	134
5.4.1. ADMET Predictor™'la yapılan tahminler.....	134
5.4.2. Farmakokinetik parametrelerin tahmin edilmesi ve modelleme	134
6. SONUÇ	139
KAYNAKLAR	141
ÖZGEÇMİŞ	151

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Mide bağırsak kanalında çözünme hızına etki eden faktörler	6
Çizelge 2.2. Mide-bağırsak kanalındaki geçiş süreleri ve pH değerleri	8
Çizelge 2.3. Mide ortamlarının içeriği ve özellikleri	13
Çizelge 2.4. İnce bağırsak ortamlarının içeriği ve özellikleri	14
Çizelge 2.5. Kalın bağırsak ortamlarının içeriği ve özellikleri	15
Çizelge 2.6. BCS'e göre ilaçların sınıflandırılması	19
Çizelge 2.7. BCS alt sınıflandırma sistemi	24
Çizelge 2.8. Hızlı salım yapan ilaçlar için BCS'e göre IVIVC değerlendirmesi	31
Çizelge 2.9. ACAT modelinin parametreleri	39
Çizelge 2.10. Molekül özellikleri.....	52
Çizelge 2.11. 0.6 mg'lık infüzyon için farmakokinetik parametrelerin karşılaştırılması	61
Çizelge 2.12. Ezetimibe ait enzim kinetikleri	68
Çizelge 3.1. İn vitro çözünme hızı test koşulları	77
Çizelge 3.2 Biyoeşdeğerlik çalışması sonuçları.....	81
Çizelge 4.1. Ezetimibin maksimum absorbans verdiği λ_{max} değerleri	83
Çizelge 4.2. FaSSIF ortam için ezetimib geri eldesi.....	87
Çizelge 4.3. FeSSIF ortam için ezetimib geri eldesi.....	88
Çizelge 4.4. FaSSIF ortamdaki tekrarlanabilirlik sonuçları.....	88
Çizelge 4.5. FeSSIF ortamdaki tekrarlanabilirlik sonuçları.....	89
Çizelge 4.6. FaSSIF ortamdaki kesinlik sonuçları.....	94
Çizelge 4.7. FeSSIF ortamdaki kesinlik sonuçları.....	94
Çizelge 4.8. Ezetimib çözünürlük çalışması sonuçları	96
Çizelge 4.9. İn vitro çözünme hızı sonuçları	98

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.10. pH 2,8 + %0,45 ortamındaki in vitro çözünme hızı sonuçları	101
Çizelge 4.11. pH 4,5 + %0,45 ortamındaki in vitro çözünme hızı sonuçları	101
Çizelge 4.12. pH 6,8 + %0,45 ortamındaki in vitro çözünme hızı sonuçları	102
Çizelge 4.13. FaSSIF ortamındaki in vitro çözünme hızı sonuçları	103
Çizelge 4.14. FeSSIF ortamındaki in vitro çözünme hızı sonuçları	103
Çizelge 4.15. pH 2,8 + %0,45 ortamındaki in vitro çözünme hızı sonuçları	104
Çizelge 4.16. pH 4,5 + %0,45 ortamındaki in vitro çözünme hızı sonuçları	104
Çizelge 4.17. pH 6,8 + %0,45 ortamındaki in vitro çözünme hızı sonuçları	105
Çizelge 4.18. FaSSIF ortamındaki in vitro çözünme hızı sonuçları	106
Çizelge 4.19. FeSSIF ortamındaki in vitro çözünme hızı sonuçları	106
Çizelge 4.20. Ezetimib için GastroPlus™ programında kullanılan veriler	107
Çizelge 4.21. İn vitro ve in siliko çözünürlük sonuçları	128

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Açlık ve tokluk durumundaki mide pH'sı	7
Şekil 2.2. Açlık ve tokluk durumunda duodenumdaki pH değişimi	7
Şekil 2.3. İn vitro çözünme hızı testlerinin kullanımı.....	10
Şekil 2.4. Danazolün biyoyararlanımına yiyecek etkisi	16
Şekil 2.5. Fenitoinin biyoyararlanımına yiyecek etkisi	16
Şekil 2.6. Meteoprolol tabletler için sepet yöntemi, 150 rpm, pH 6,8	36
Şekil 2.7. In vivo datanın % emilen oranına dönüştürülmesi	37
Şekil 2.8. Metoprololün emilen ve çözünen oranları arasında kurulan IVIVC	37
Şekil 2.9. İnce bağırsak geçiş süreleri	39
Şekil 2.10. Risperidon referans ve test ürünleri için oluşturulmuş modelleri	48
Şekil 2.11. Efavirenz tabletlerin plazma-konsantrasyon eğrileri	49
Şekil 2.12. Referans ve test ürünleri için plazma konsantrasyonları	49
Şekil 2.13. Gliklazid tabletler için plazma konsantrasyonları	50
Şekil 2.14. Ezetimib ve ezetimib-glukuronidin kimyasal yapıları	64
Şekil 2.15. Ezetimibin ezetimib-glukuronide dönüştürülmesi	67
Şekil 3.1 Test ve referans ürünleri plazma konsantrasyonu-zaman eğrileri	80
Şekil 3.2 Test ve referans ürünleri plazma konsantrasyonu-zaman eğrileri	80
Şekil 4.1. pH 2,8 + SLS ve pH 4,5 + SLS ortamlarındaki HPLC spektrumları	83
Şekil 4.2. pH 6,8 + SLS in vitro çözünme ortamındaki HPLC spektrumu.....	84
Şekil 4.3. Kör FaSSIF ve FaSSIF çözünme ortamlarındaki HPLC spektrumları.....	84
Şekil 4.4. Kör FeSSIF ve FeSSIF çözünme ortamlarındaki HPLC spektrumları.....	84
Şekil 4.5. Ezetimibin pH 2,8 + %0,45 SLS ortamındaki standart doğrusu	85
Şekil 4.6. Ezetimibin pH 4,5 + %0,45 SLS ortamındaki standart doğrusu	85

Şekil	Sayfa
Şekil 4.7. Ezetimibin pH 6,8 + %0,45 SLS ortamındaki standart doğrusu	86
Şekil 4.8. Ezetimibin FaSSIF in vitro çözünme ortamındaki standart doğrusu.....	86
Şekil 4.9. Ezetimibin FeSSIF in vitro çözünme ortamındaki standart doğrusu.....	87
Şekil 4.10. FaSSIF ortamının kromatogramı	90
Şekil 4.11. FaSSIF ortamındaki plasebo çözeltisinin kromatogramı.....	90
Şekil 4.12. FaSSIF ortamındaki standart çözeltisinin kromatogramı	91
Şekil 4.13. FaSSIF ortamındaki in vitro çözünme hızı örneğinin kromatogramı.....	91
Şekil 4.14. FeSSIF ortamının kromatogramı	92
Şekil 4.15. FeSSIF ortamdaki plasebo çözeltisinin kromatogramı.....	92
Şekil 4.17. FeSSIF ortamdaki standart çözeltisinin kromatogramı	93
Şekil 4.18. FeSSIF ortamdaki çözünme hızı örneğinin kromatogramı.....	93
Şekil 4.18. Ezetimibin 25°C’de FaSSIF ortamındaki stabilitesi.....	95
Şekil 4.19. Ezetimibin 25°C’de FeSSIF ortamındaki stabilitesi.....	95
Şekil 4.20. Ezetimibin pH-çözünürlük profili grafik içinde çözünürlük	96
Şekil 4.21. Ezetimib 10 mg tablet in vitro çözünme hızı profilleri.....	99
Şekil 4.22. Ezetrol 10 mg tablet in vitro çözünme hızı profilleri	99
Şekil 4.23. Biyouyumlu ortamlarda karşılaştırmalı in vitro çözünme hızı profilleri.....	100
Şekil 4.24. Ezetrol 10 mg tablet plazma konsantrasyonu zaman eğrisi.....	115
Şekil 4.25. Ezetimib 10 mg tablet plazma konsantrasyonu zaman eğrisi.....	115
Şekil 4.26. Ezetimib 10 mg tablet için 44 gönüllüye ait sonuçlar	117
Şekil 4.27. Ezetrol 10 mg tablet için 44 gönüllüye ait sonuçlar	117

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. FaSSIF FeSSIF FaSSGF Powder	17
Resim 2.2. Oral yolla alınan bir ilacın mide-bağırsak kanalında izlediği yol	18
Resim 2.3. Teorell'in ilaç moleküllerinin vücuttaki dağılımını gösteren orijinal çizim.	26
Resim 2.4. Örnek PBPK modelinin yapısı.....	28
Resim 2.5. İn vitro in vivo korelasyon (IVIVC) geliştirilmesi	34
Resim 2.6. ACAT modelinin şematik gösterimi.....	40
Resim 2.7. Bölgesel permeabilite	44
Resim 2.8. Teofilin uzun salımlı tabletlerin a GastroPlus™'la simülasyonu.....	47
Resim 2.9. ZTV01 molekülü için molekül özellikleri sekmesi	53
Resim 2.10. ZTV01 molekülünün pH-çözünürlük profili	54
Resim 2.11. ZTV01 molekülünün pH-çözünürlük modeli	54
Resim 2.12. ZTV01 molekülünün pH-logD eğrisi	55
Resim 2.13. ZTV01 molekülü için biyoyoumlu çözünürlük sekmesi	56
Resim 2.14. ZTV01 molekülü için fizyolojik özellikler ekranı.....	57
Resim 2.15. ZTV01 molekülüne ait literatürden elde edilmiş IV veri	58
Resim 2.16. 1 ve 2 kompartımanlı model uyarlanmasıyla elde edilen grafikler	58
Resim 2.17. Farmakokinetik parametrelerin elde edilmesi	59
Resim 2.18. PKPlus modülünden farmakokinetik sekmesine aktarılmış parametreler ..	60
Resim 2.19. Simülasyon ekranı	61
Resim 2.20. ZTV01 molekülü için elde edilmiş konsantrasyon-zaman grafiği	62
Resim 2.21. 10 mg'lık uzun salımlı tabletlerin konsantrasyon-zaman eğrisi	63
Resim 2.22. Ezetimibin enterohepatik sirkülasyonu.....	68
Resim 4.1. Ezetimib için molekül özellikleri sekmesi.....	108

Resim	Sayfa
Resim 4.2. pK_a tablosu.....	109
Resim 4.3. pH-LogD tablosu	109
Resim 4.4. Enzim etkisi	110
Resim 4.5. In vitro in vivo ekstrapolasyon ekranı	111
Resim 4.6. Taşıyıcı etkisi.....	112
Resim 4.7. Partikül büyüklüğü tablosu	113
Resim 4.8. Biyoyoumlu çözünürlük sekmesi	114
Resim 4.9. Çoklu tekrarlı doz tablosu.....	116
Resim 4.10. Ezetimib için fizyoloji ekranı	118
Resim 4.11. PBPK modelinin şematik gösterimi.....	119
Resim 4.12. PBPK modelinde karaciğerin genel özellikleri.....	120
Resim 4.13. PBPK modelinde karaciğerin enzim özellikleri	120
Resim 4.14. PBPK modelinde böbreğin genel özellikleri	121
Resim 4.15. PBPK modelinde böbreğin enzim özellikleri	121
Resim 4.16. Karaciğer atardamarının özellikleri	122
Resim 4.17. Aortun özellikleri.....	122
Resim 4.18. Ezetimib için simülasyon ekranı.....	123
Resim 4.19. Çoklu tekrarlı doz için elde edilen plazma konsantrasyon eğrisi	124
Resim 4.20. Ezetimib için bölgesel emilim	125
Resim 4.21. Emilim ve çözünme profilleri	126
Resim 4.22. IR tablet için molekül özellikleri ekranı	127
Resim 4.23. IR tablet için elde edilen plazma konsantrasyon eğrisi	127
Resim 4.24. İn vitro çözünürlük verileriyle elde edilen plazma konsantrasyon eğrisi ...	128

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
$[A^-]$	Zayıf asite ait konjuge bazın molar derişimi
$[HA]$	İyonlaşmamış zayıf asitin molar derişimi
A_n	Emilme sayısı
C	Çözünme ortamındaki etkin madde derişimi, mg/mL
C_{max}	Doruk plazma konsantrasyonu
C_s	Çözünürlük, mg/mL
D	Difüzyon katsayısı, cm^2/sn
D_0	Doz sayısı
D_n	Çözünme sayısı
f_2	Benzerlik faktörü
f_p	Plazma proteinlerine bağlanma oranı
f_u	Plazma proteinlerine bağlanmamış ilaç oranı
k	Hız sabiti
K_p	Serbest haldeki ilacın dokulara dağılım oranı
$LogD$	Dağılım katsayısı
$LogP$	Partisyon katsayısı
M	Doz, mg
P_{eff}	Efektif permeabilite, $cm/sn \times 10^4$
r	İnce bağırsağın yarıçapı, cm
R	Partikül yarıçapı, μm
R^2	Determinasyon katsayısı
R_b	Kan hücrelerine bağlanma oranı
$t_{1/2}$	Yarılanma ömrü
t_{Diss}	İlacın çözünme süresi, sn

Simgeler**Açıklamalar**

$t_{\max}$	Doruk plazma konsantrasyonuna ulaşma süresi
t_{res}	İlacın vücutta kalış süresi, sn
V_0	Hacim, mL
V_d	Sanal dağılım hacmi
X_{ort}	Ortalama değerler
λ_{maks}	Maksimum dalga boyu
ρ	Yoğunluk, mg/mL

Kısaltmalar**Açıklamalar**

ACAT	Gelişmiş kompartmental geçiş ve emilim modeli
ASF	Emilim faktörü
AUC	Eğri altında kalan alan
BCS	Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi
CAT	Kompartmental geçiş ve emilim modeli
CL	Klirens
CMC	Kritik misel konsantrasyonu
EMA	Avrupa İlaç Değerlendirme Ajansı
FaSSCoF	Açlık durumunu taklit eden kalın bağırsak ortamı
FaSSGF	Açlık durumunu taklit eden yapay mide ortamı
FaSSIF	Açlık durumunu taklit eden ince bağırsak ortamı
FDA	Amerikan İlaç ve Gıda İdaresi
FeSSCoF	Tokluk durumnu taklit eden kalın bağırsak ortamı
FeSSGF	Tokluk durumunu taklit eden mide ortamı
FeSSIF	Tokluk durumnu taklit eden ince bağırsak ortamı
FPE	İlk geçiş etkisi
GMK	Göç eden motor kompleks
GST	Gastrointestinal Simülasyon Teknolojisi
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A

Kısaltmalar**Açıklamalar**

HoFH	Homozigot ailevi hiperkolesterolemi
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
IVIVC	İn vitro in vivo korelasyon
K_m	Michaelis-Menten sabiti
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
MRP	Multi rezistant protein
MSD	Merck Sharp and Dohme
PKPK modeling	Fizyolojik Temelli Farmakokinetik Modelleme
SGF	Yapay mide ortamı
SIF	Yapay bağırsak ortamı
SLS	Sodyum lauril sülfat
SS	Standart sapma
SUPAC	Ölçek artırma ve başvuru sonrası değişiklikler
TEER	Trans epitelyal elektriksel rezistans
TJ	Sıkı bağlantı noktaları
UGT	UDP-glukuronosiltransferaz
V_{max}	Maksimum reaksiyon hızı
VK	Varyasyon katsayısı

1. GİRİŞ

Son yıllarda, ilaçların in vivo davranışının belirlenmesinde, in vivo çalışmalar yanında BCS temelli biyofarmasötik değerlendirmeler, in siliko yaklaşımlar, farmakokinetik modellemeler kullanılarak yapılan simülasyonlar ve in vitro in vivo korelasyon (IVIVC) değerlendirmeleri önem kazanmıştır.

Bir ilacın vücuttaki çözünme özellikleri, ilaç emilimini doğrudan etkileyeceği için, dozaj şeklinin in vitro çözünme hızı ve salım özellikleri ürünlerin in vivo performansını doğrudan etkiler. Günümüzde, in vivo performansın tahmininde değişik oranda safra tuzu ve lesitin karışımları içeren ve in vivo çözünme koşullarına klasik in vitro çözünme ortamlarına göre daha fazla benzerlik gösteren biyouyumlu çözünme ortamlarının kullanımı tercih edilmektedir.

Bu çalışmanın temel amacı, in vivo plazma konsantrasyon verileri Zentiva Sağlık Ürünleri tarafından sağlanan ezetimib molekülü için klasik ve biyouyumlu in vitro çözünme ortamlarından elde edilen in vitro çözünme hızı verilerini kullanarak bilgisayar simülasyonlarıyla farmasötik değerlendirmeler yapabilmektir. Ayrıca, ezetimib için farmakokinetik modelleme ve IVIVC değerlendirmesi yaparak, biyouyumlu çözünme ortamlarının korelasyona olan etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla tüm vücudu simüle eden bir PBPK modeli olan GastroPlus™ programında ACAT modeli kullanılmıştır.

Çalışmalarda öncelikle in vitro çözünürlük ve çözünme hızı çalışmaları deneysel olarak yapılmıştır. ADMET Predictor™ ile in siliko çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Biyoeşdeğerlik çalışmasından elde edilen in vivo verilerinin de değerlendirilmesiyle model madde olarak seçilen ezetimib için fizyolojik temelli farmakokinetik bir model oluşturulmasına çalışılmıştır.

Çalışmalar kapsamında, ilk olarak ezetimib molekülünün analizi için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemiyle metot validasyonu yapılmış, çözünürlük ve in vitro çözünme hızı çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İn siliko çalışmalar, literatürden sağlanamayan veya in vitro olarak ölçülemeyen verilerin tahmin edilmesine yönelik çalışmalar ve kestirim çalışmaları olarak iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Molekül

özellikleri ADMET Predictor™, farmakokinetik modelleme GastroPlus™ programlarıyla yapılmıştır. İn vivo veriler olarak, Zentiva Sağlık Ürünleri tarafından geliştirilen Ezetimib 10 mg tablet ürününün Merck Sharp and Dohme (MSD)'ye ait Ezetrol 10 mg tablet ürünüyle biyoeşdeğer olduğunu göstermek için 18-55 yaş arası, 44 erkek gönüllü üzerinde, açlık durumunda gerçekleştirilmiş olan tek dozlu, iki yönlü, çapraz tasarımlı biyoeşdeğerlik çalışmasından elde edilmiş zamana karşılık plazma konsantrasyonu verileri kullanılmıştır.

Ezetimib, düşük çözünürlük ve yüksek permeabilite özelliği gösteren Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi (BCS)'ne göre Sınıf 2'ye ait bir etkin maddedir. Bu nedenle biyoyoumlu ortamların ezetimibin çözünürlüğünü artırması beklenmiştir. Ayrıca ezetimib, ilk geçiş etkisine maruz kalan, enterohepatik sirkülasyona giren bir molekül olup metabolizma ve taşıyıcı kinetiği açısından oldukça karmaşıktır. Tez kapsamında, bu molekülle simülasyon çalışmalarına başlanmadan önce GastroPlus™ programının kullanılmasının öğrenilmesi amacıyla Zentiva Sağlık Ürünleri'ne ait uzun salım yapan BCS Sınıf 1 bir molekül olan ZTV01 üzerinden modelleme çalışmaları yapılmıştır. Bu molekülle deneyim kazanıldıktan sonra ezetimibin modellenmesine geçilmiştir. Yapılan çalışmalarla, GastroPlus™'in çeşitli özellikleri kullanılarak enterohepatik sirkülasyon ve metabolizma etkisi simüle edilmiştir.

Ezetimib molekülünün çözünürlük probleminden dolayı IV uygulaması bulunmadığından oral emilimin tahmininde zorluklarla karşılaşmıştır. Molekül özelliklerinin ve metabolizma kinetiğinin tanımlanmasında in siliko metotlardan yararlanılmıştır. Bu veriler girdi olarak kullanılarak ezetimib için fizyolojik temelli farmakokinetik modelleme yaklaşımıyla enterohepatik sirkülasyonu ve metabolizma kinetiklerini göz önüne alan bir farmakokinetik model oluşturulmuştur. Oluşturulan modelde, ortalama plazma konsantrasyon eğrisi simüle edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Çözünürlük ve Çözünme Hızı

Çözünürlük, çözünme hızı ve membranlardan geçiş özelliği (permeabilite) bir ilacın biyoyararlanımında rol oynayan temel parametrelerdir. Çözünürlük, bir etkin maddenin bir çözücünde belirli sıcaklık derecesinde çözünebildiği en yüksek miktardır. Buna doygunluk konsantrasyonu da denir [2, 3]. Oral yolla verilen bir ilacın sudaki çözünürlüğü, vücut içinde ilaç emilimini etkileyen önemli bir etmendir [4].

pK_a ve pH ilişkisi bir ilacın çözünürlüğünün belirlenmesinde etkilidir. İlaçların çoğu zayıf asit veya baz oldukları için, belirli bir pH'da, nötr ve iyonlaşmış haldeki moleküller dengededir. Zayıf baz ve asitlerin çözünürlüğü iyonizasyon katsayılarına ve ortamın pH'sına bağlıdır. Bu ilişki Henderson-Hasselbach denklemiyle gösterilir [5, 6].

$$pH = pK_a + \log ([A^-]/[HA]) \quad (2.1)$$

pK_a : Asit iyonlaşma sabitinin eksi logaritması

[HA]: İyonlaşmamış zayıf asitin molar derişimi

$[A^-]$: Zayıf asite ait konjuge bazın molar derişimi

Henderson-Hasselbach denklemi vücut içindeki değişken pH ortamında ilacın iyonize veya non-iyonize formunun belirlenmesi açısından önemlidir. İlacın nötr veya iyonlaşmış halde olması hem çözünme hem de permeabilite açılarından önemlidir. Zayıf baz özellikteki ilaçlar yüksek pH'larda daha düşük çözünürlüğe sahipken (ilacın daha büyük bir kısmı iyonlaşmamış haldedir), zayıf asit özelliği gösteren ilaçlar yüksek pH'da daha iyi çözünürler (ilacın daha büyük bir kısmı iyonlaşmış haldedir) [5, 7].

Mide bağırsak kanalında, yüzey etkin maddeler, pH değişimleri, tampon kapasitesi ve yiyecekler ilacın çözünürlüğünü değiştirebilir. Örneğin, zayıf baz özelliği gösteren indinavir (pK_a 3,7 ve 5,9) yiyecek alımından sonra mide pH'sı yükseleceği için çökme gösterir. Bu durum, eğri altında kalan alan (AUC) ve doruk plazma konsantrasyonu (C_{max}) değerlerinde ilacı aç karnına alan gönüllülere oranla düşük bulunmuştur. Oysaki

yiyeceklerin neden olduğu pH yükselmesi zayıf asit özelliğindeki bir ilacın iyonlaşmasını artıracak için çözünürlüğünü artırır [5, 8].

Bir etkin maddenin çözünürlüğü, iyon gruplarının, polar grupların veya hidrojen bağlarının eklenmesi gibi yapısal değişiklikler, logP değerinin, molekül ağırlığının veya ön ilaç formlarının oluşturulması gibi yöntemlerle artırılabilir [7].

Çözünme hızı, bir ilacın birim zamanda dozaj şeklinden salınan yani çözünme ortamına geçen miktarıdır. Fick'in 1. Yasası'na göre birbirlerinden yarı geçirgen bir zarla ayrılmış olan iki alandaki madde geçişi, bu alanlar arasındaki derişim farkıyla doğru orantılıdır [9].

Çözünme hızı, ilk defa Noyes ve Whitney tarafından ortaya konulan denklemde Fick'in 1. Yasası'ndan hareketle yola çıkılmıştır. Noyes-Whitney eşitliğine göre çözünme hızı, aşağıdaki eşitlikle tanımlanır [10, 11].

$$\frac{dC}{dt} = k (C_s - C) \quad (2.2)$$

dC/dt : Çözünme hızı

k: Hız sabiti

C: Çözünme ortamındaki etkin madde derişimi (mg/mL)

C_s : Çözünürlük (mg/mL)

Nerst ve Brunner, bu denklemi difüzyon tabakasını düşünerek geliştirmişlerdir. Nerst ve Brunner'e göre, katı-sıvı ara yüzeyinde denge (doygunluk) söz konusudur. Çözünme, katı yüzeyini saran çok ince ve sabit difüzyon tabakasından çözücüye doğru gerçekleşir.

Nerst ve Brunner Noyes-Whitney eşitliğini aşağıdaki şekilde geliştirmişlerdir [5, 11, 12].

$$\frac{dC}{dt} = \frac{DS}{Vh} (C_s - C) \quad (2.3)$$

dC/dt : Çözünme hızı

S: Çözünen katının yüzey alanı (cm^2)

C: Ortamdaki çözünmüş etkin madde derişimi (mg/mL)

C_s : Çözünürlük (mg/mL)

D: Difüzyon katsayısı (cm^2/sn)

V: Çözünme ortamının hacmi (mL)

h: Difüzyon tabakasının kalınlığı (cm)

Difüzyon katsayısı, sıcaklık, ortam viskozitesi, etkin maddenin yarıçapı ve Boltzman sabitine bağlıdır.

2.2. Mide-Bağırsak Kanalında Çözünme ve Çözünme Hızına Etki Eden Faktörler

Mide-bağırsak kanalının karmaşık fizyolojisi, oral yoldan alınan ilaçların çözünürlük, çözünme hızı ve emilimini doğrudan etkiler. Mide-bağırsak kanalı pH'sı, tampon kapasitesi, yüzey etkin maddeler, mide-bağırsak sıvılarının hacmi, enzimler gibi faktörler etkin madde çözünürlüğü ve çözünme hızı üzerinde etkilidir [12]. Çözünme hızına etki eden fizikokimyasal ve fizyolojik parametreler Çizelge 2.1'de özetlenmektedir.

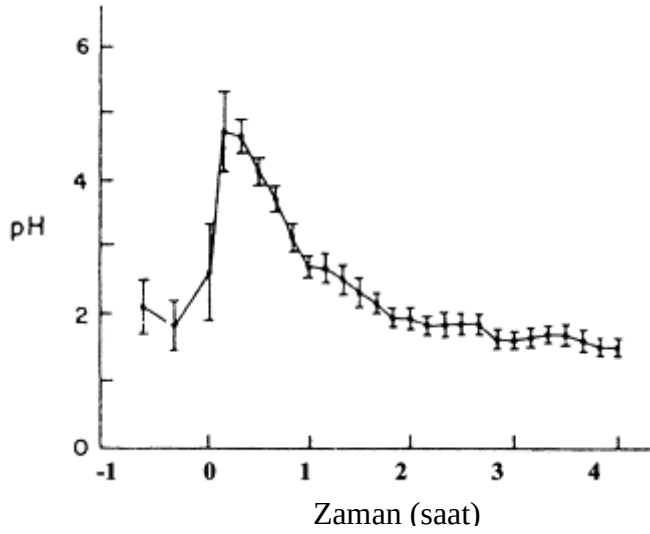
Çizelge 2.1. Mide bağırsak kanalında çözünme hızına etki eden faktörler [11]

Faktör	Fizikokimyasal Parametreler	Fizyolojik Parametreler
Etkin madde yüzey alanı (A)	Partikül büyüklüğü, ıslanabilirlik	Mide sıvısı ve safrada bulunan yüzey etkin maddeler
Difüzyon katsayısı (D)	Molekül büyüklüğü	Lümen içi sıvısının viskozitesi
Difüzyon tabakasının kalınlığı (h)	-	Mide-bağırsak kanalı motilitesi ve akış hızı
Çözünürlük (C_s)	Hidrofilik özellik, kristal yapı, çözünürlük	pH, tampon kapasitesi, safra tuzları ve yiyecek etkisi
Çözünmüş ilaç derişimi (C)	-	Permeabilite
Çözücü hacmi (V)	-	Mide-bağırsak kanalı salgıları, alınan sıvı miktarı

2.2.1. Mide-bağırsak kanalının fizyolojisi

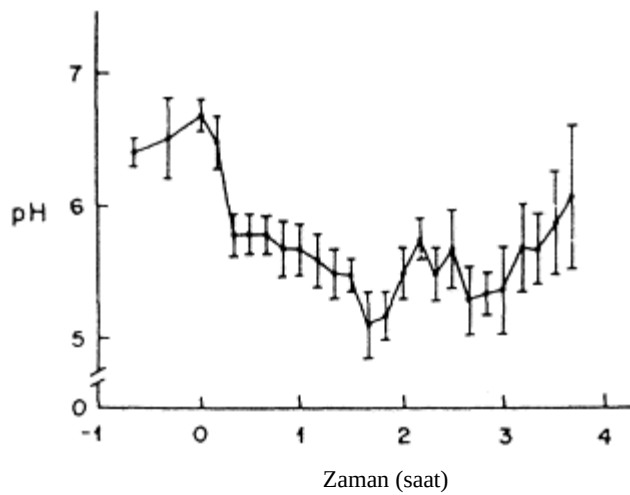
Ağız yoluyla alınan bir ilacın emilebilmesi için çözünmesi ve mide bağırsak kanalından geçmesi gereklidir. Ağızdan alınan bir ilaç, ilk önce yemek borusu yoluyla mideye gelir. Midede sindirim başlar. Mide-bağırsak kanalı boyunca pH değişiklik gösterir. Mide ortamı asidikken, ince bağırsak asidik-nötr, kalın bağırsak ise bazik bir ortamdır. Emilimin büyük bir kısmı, pH çeşitliliği, uzun geçiş süresi ve yüzey alanının fazla olması gibi etkenler nedeniyle ince bağırsakta gerçekleşir.

Aç karnına mide pH'sı 1-3 arasındadır. Yiyecek alımından sonra tampon etkisiyle pH yükselir. Daha sonra yiyeceğin içeriğine göre 2-3 saat içinde normal haline pH'sına geri döner [12]. Açlık ve tokluk durumlarındaki mide pH'sı Şekil 2.1'de gösterilmektedir.



Şekil 2.1. Açlık ve tokluk durumundaki mide pH'sı [12]

İnce bağırsağın 3 bölgesi vardır: Duodenum, jejunum ve ileum. İnce bağırsak, mideye göre daha bazik bir ortamdır. Proksimal bölgelerde (duodenum) açlık durumunda pH 6,0-6,5 civarındadır [13]. Yiyecek alımıyla duodenum ve hatta jejunumda pH 5,0-5,5'a düşer. İleumun distal bölgelerinde ise 7,5 civarında daha sabit bir pH değeri vardır. Açlık ve tokluk durumlarında duodenumdaki pH değişimi Şekil 2.2'de gösterilmektedir. Kalın bağırsakta ise pH 5,0-8,0 arasında değişir [12]. Mide-bağırsak kanalının farklı bölgelerindeki açlık ve tokluk durumlarındaki pH değerleri ve geçiş süreleri Çizelge 2.2'de özetlenmiştir.



Şekil 2.2. Açlık ve tokluk durumunda duodenumdaki pH değişimi [12]

Çizelge 2.2. Mide-bağırsak kanalındaki geçiş süreleri ve pH değerleri [12, 14, 15]

Mide-Bağırsak Kanalındaki Konum	Açlık Durumu	Tokluk Durumu	Geçiş Süresi
Mide	1,3	4,9	0,5 – 3,5 saat
Duodenum	4,9 - 6,4	5,1 - 5,4	3 - 4 saat
Jejunum	4,4 - 6,6	5,2 - 6,2	3 -4 saat
İleum	6,5 - 7,4	6,8 - 8,0	3 - 4 saat
Kalın bağırsak	5,0 – 8,0	5,0 – 8,0	1 - 3 gün

2.2.2. Tampon kapasitesi

Zayıf asit ve bazların çözünmesinde difüzyon tabakasındaki pH değeri etkili ve önemlidir. Bu değer, ortamın tamponlama kapasitesine, etkin maddenin pK_a değerine ve çözünürlüğüne bağlıdır ve ortam pH'sından farklı olabilir. Çözünmekte olan katının yüzeyindeki pH değeri, iyonlaşmayı ve yüzey pH'sını etkileyebilir [5].

2.2.3. Yüzey etkin maddeler

Mide-bağırsak kanalında bulunan yüzey etkin maddeler etkin maddenin ıslanabilirliğini artırır. Islanabilirlik, katı-sıvı yüzeyindeki temas açısıyla ilgilidir. Mide sıvısının yüzey gerilimi sudan daha düşüktür ve bu da, bu bölgede yüzey etkin madde bulunduğunun bir göstergesidir. Açlık durumunda, yüzey gerilimi $35-45 \text{ mNm}^{-1}$ 'dir. İnce bağırsakta bulunan safra tuzları düşük çözünürlüğe sahip etkin maddelerin ıslanabilirliğini artırır. Açlık durumundaki 3-6 mM'lık safra tuzu konsantrasyonu temas açısını önemli ölçüde düşürür. Safra tuzları ve lesitin salgılanması açlık durumunda bile misellerin oluşumuna neden olur [12].

2.2.4. Enzimler

Mide sıvısında bulunan başlıca enzim eksopeptidaz grubuna ait bir enzim olan pepsindir. Yiyecek alımından sonra ince bağırsakta sindirim enzimleri (lipaz, amilaz ve proteaz) salgılanır. Pepsin ve proteaz enzimleri protein sindiriminde rol alırken, lipazlar yağ

sindiriminde rol alır. Ayrıca, yağ içeren dozaj şekillerinden etkin madde salımını da etkileyebilirler. İleumun distal bölgelerinde ve kalın bağırsakta bulunan bakteriler de enzim salgırlarlar. Kalın bağırsağa ilaç taşınmasını sağlayan bazı dozaj şekillerinde bu bakterilerin salgıladıkları enzimlerden yararlanılır. Bu bakterilerin etkinliği kalın bağırsak pH'sında değişikliklere yol açabilir [12].

2.2.5. Hacim

İlacın mide-bağırsak kanalında çözünbilmesi için gerekli sıvı miktarı, ilaçla birlikte alınan sıvı miktarına, mide-bağırsak kanalı salgılarına ve bağırsak duvarından geçen sıvı miktarına bağlıdır. Açlık durumundaki midenin hacmi 20-30 mL'ye kadar düşebilir. Mide hacmi 1,5 L'yi aştığında mide basıncı artmaya başlar. Kişiyeye bağlı olarak günde yaklaşık 1,5-2 L sıvı alımı söz konusu olabilir. Kişinin vücut ağırlığına, aktivite ve kişisel alışkanlıklarına bağlı olarak bu miktar değişebilir. Tükürük bezleri, karaciğer ve pankreasın salgılarıyla birlikte toplam 6 L'yi bulan salgılar normal sindirim için gereklidir. Pankreas ve safra salgıları yiyecek alımından sonra başlar. 24 saat içinde duodenuma 1-2 L pankreatik sıvı salgılanırken, 600 mL safra salgılanır [12].

2.2.6. Mide-bağırsak kanalının hidrodinamik özellikleri

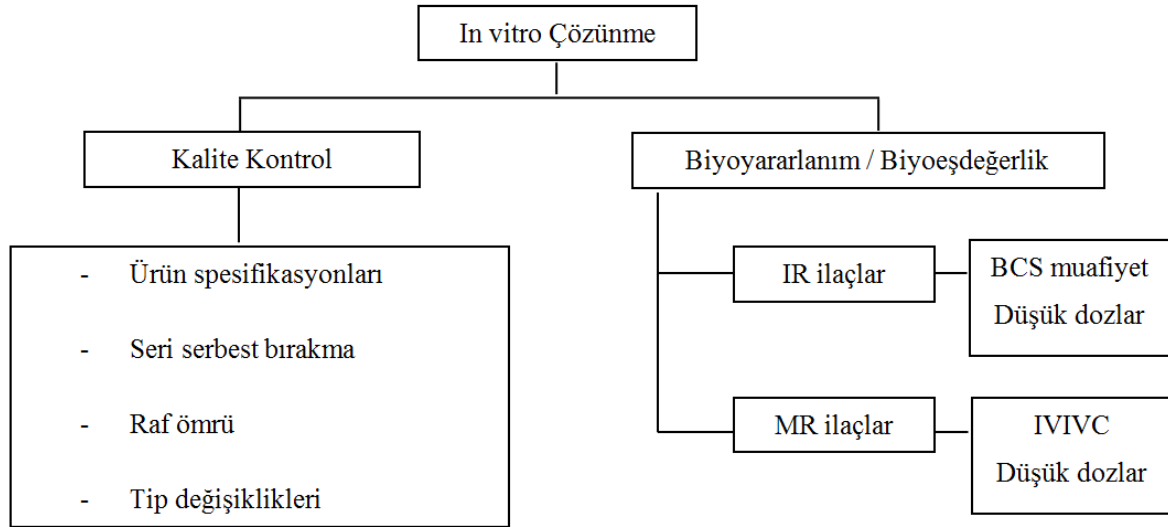
Mide-bağırsak hareketleri (motilite), ilacın ince bağırsağa giriş hızı, ince bağırsakta kalış süresi ve mide-bağırsak kanalı sıvılarıyla etkileşimini etkiler. Yemek borusu, ağızla mideyi birbirine bağlar ve senkronize peristaltik hareketler ile ağız yoluyla alınan ilaçların saniyeler içinde mideye ulaşmasını sağlar. İlaçların midede kalış süresi açlık tokluk durumuna göre değişir. Açlık durumunda midede çok az hareket vardır. Göç eden motor kompleks (GMK) açlık durumunda gastrik motiliteyle harekete geçer. GMK 3 faza ayrılır: Faz I durgun fazı, Faz II aralıklı ve düzensiz kasılma aktivitesini, Faz III katı ve sıvıların mideden bağırsaklara doğru hareketini ifade eder. Her 2 saatte bir kasılmalar başlar ve giderek şiddetlenerek mide boşalmasına neden olur. İnce bağırsakta, bölgesel kasılmalar ve yayılan kasılmalar söz konusudur. Yayılan kasılmalar lumen içi sıvının 20-25 cm gibi uzun mesafelerde ilerlemesini sağlarken, bölgesel kasılmalar 1-4 cm gibi kısa mesafeli kasılmalara neden olur ve lümen içi sıvının karışmasını sağlar. Bu hareketler ilacın emilim miktarını etkiler. Açlık durumunda uzun mesafeli kasılmaların gerçekleştiği Faz 3'te emilim en azdır. Faz 1 ve Faz 2'de emilim orta düzeydedir. Tokluk durumunda ise daha iyi karışma ve çözünmenin etkisiyle emilim artar [5, 16, 17].

2.3. In Vitro Çözünme Hızı Testlerinin Kullanımı

İn vitro çözünme hızı testleri, ürün geliştirme çalışmalarının farklı aşamalarında farklı amaçlar için kullanılır. İn vitro çözünme hızı çalışmalarından, formülasyon geliştirme, üretim akışının izlenmesi, ürün kalitesinin değerlendirilmesi ve bazı durumlarda ürünün in vivo performansının tahmin edilmesi gibi alanlarda yararlanılmaktadır [18]. Kalite kontrolü amacıyla kullanılan testlerde belirli bir sürede dozaj şeklinden etkin madde salımı incelenir. İn vitro çözünme hızı testleri aynı zamanda bir ilacın in vivo performansının değerlendirilmesinde de kullanılabilir. İn vitro çözünme hızı testleri, ilacın biyofarmasötik değerlendirmesinde kullanılan ve otoriteler tarafından kabul edilmiş standart testlerdir [19].

Bir ilacın in vivo çözünme özellikleri, ilaç emiliminin doğrudan etkileyeceği için, in vitro çözünme hızı ve salım özellikleri, ürünlerin in vivo performansının doğrudan etkiler [20].

İn vitro çözünme hızı testlerinin kullanımı Şekil 2.3'te özetlenmiştir [18].



Şekil 2.3. İn vitro çözünme hızı testlerinin kullanımı

İn vitro çözünme hızı testlerinde, çözünme ortamı, kullanılan alet, çözünme koşulları ve çözünme hızı tayin yöntemleri gibi parametreler önemlidir. İn vitro çözünme hızı, çözünürlüğü düşük ilaçların emiliminde hız belirleyici adımdır. Bu nedenle, zor çözünen ilaçlar için kullanılacak çözünme ortamı çok önemlidir [3]. Fizyolojik koşullara benzer ortamlarda gerçekleştirilen çözünme hızı testleri, ilaçların in vivo performansını tahmin

etmede rol oynarken, kalite kontrolünde kılavuzlar tarafından kabul edilen klasik çözünme ortamlarının kullanılması yeterlidir. Test koşulları belirlenirken, ilacın fizikokimyasal özellikleri ve dozaj şeklinin vücut içerisinde maruz kalacağı koşullar da göz önüne alınmalıdır [4].

2.3.1. In vitro çözünme ortamları

Klasik in vitro çözünme ortamları

İn vitro çözünme hızı testleri için farmakopelerde çözünme ortamları belirlenmiştir. Bu çözünme ortamlarının pH'ları 1,2 ile 8,0 arasında değişir. İn vitro çözünme hızı testleri genellikle mide pH'sına karşılık gelen pH 1,2 ve ince bağırsak pH'larına karşılık gelen pH 4,5 ve pH 6,8'de gerçekleştirilir. Ayrıca bazı ilaçlara özgü çözünme ortamları da tanımlanmıştır [21].

Yüzey etkin madde içeren in vitro çözünme ortamları

Yüzey etkin maddeler, in vitro çözünme hızı testlerinde düşük çözünürlüklü ilaçların ıslanabilirliğini ve çözünürlüğünü artırmak amacıyla kullanılırlar. Yüzey etkin maddeler, çözücü ve çözünen arasındaki yüzey gerilimini düşürürler ve etkin maddenin miseller içerisinde hapsolmasını sağlayarak çözünürlüğünü artırır. Hem hidrofilik hem hidrofobik kısımları bulunan yüzey etkin maddeler, anyonik (örn: sodyum lauril sülfat), katyonik (örn: setil trimetil amonyum bromür), amfoterik (örn: alkil betain) ve non-iyonik (örn: tween) halde bulunabilirler [22].

Kullanılacak yüzey etkin maddenin cinsi ve derişimi in vitro çözünme hızı testlerinde önemlidir. İn vitro çözünme ortamına belirli miktarlarda yüzey etkin madde katılarak ve derişim yavaş yavaş artırılarak (% 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,0) gerekli yüzey etkin madde miktarı belirlenir. Yüzey etkin maddenin seçimi ve derişimi etkin maddenin özelliklerine göre belirlenir; ancak genellikle en fazla %2 oranında kullanılır. Amaç, en az miktarda yüzey etkin madde kullanılarak %85 çözünen miktarına 2 saatten az bir sürede erişebilmektir [23].

Biyoyumlu çözünme ortamları

Biyoyumlu çözünme ortamları, ince bağırsakta doğal olarak bulunan safra tuzları (sodyum taurokolat) ve fosfolipidleri (lesitin) içeren çözünme ortamlarıdır. Bu doğal yüzey etkin maddeler misel oluşumuna olanak sağlayarak özellikle düşük çözünürlüklü etkin maddelerin çözünmesinde önemli rol oynarlar [24].

Klasik in vitro çözünme ortamlarında sadece mide-bağırsak kanalının pH'sı taklit edilirken, biyoyumlu çözünme ortamlarında, osmolalite, tampon kapasitesi, yüzey gerilimi, viskozite gibi fizyolojik özellikler de taklit edilmiş olur. Ayrıca, bu ortamlarda açlık ve tokluk durumlarındaki fizyolojik farklılıklar da dikkate alınır [25].

Biyoyumlu çözünme ortamlarının avantajları aşağıdadır sıralanmaktadır:

- Biyoyumlu çözünme ortamları, in vivo fizyolojik koşullara benzerlik göstermeleri nedeniyle in vivo ortamda ilacın nasıl davranacağını kestirimini ve açlık-tokluk durumlarında yiyeceklerin ilaç biyoyararlanımına etkisinin tahminini sağlar [26].
- Biyoyumlu ortamlar, özellikle az çözünen BCS Sınıf 2 ilaçlar için kritik önem taşımaktadır. Bu grup ilaçların çözünürlük ve çözünme hızlarını artırabilirler.
- Açlık-tokluk durumlarının ilaç emilimi üzerine etkilerinin araştırılması son derece önemlidir zira bazı ilaçların biyoyararlanımları yiyeceklerle birlikte alındığında değişmektedir. Biyoyumlu ortamlar, yiyecek etkisinin tahmininde ve biyoyararlanım değerlendirmelerinde rol oynar. Özellikle yağlı yiyeceklerin ilaç emilimine dolayısıyla biyoyararlanımına etkisinin incelenbilmesine olanak sağlar [27].
- Terapötik indeksi dar olan ilaçlarda yiyecek etkisinin önceden tahmin edilmesi de oldukça önemlidir. Bu ilaçlarda yiyecek, ilacın etkisini ve/veya toksisitesini etkilemektedir.

Mide, ince bağırsak ve kalın bağırsağın açlık tokluk durumlarındaki içerik ve özellikleri incelenmiş ve buna göre biyoyumlu çözünme ortamları tanımlanmıştır [13, 20, 28, 29].

Mide ortamı

Simüle edilmiş mide ortamı (SGF), USP’de tanımlanmış bir ortamdır. Dressman ve diğerleri [30] ve Diakidou ve diğerleri [29], bu ortama sentetik yüzey etkin maddeler eklenmesiyle yüzey gerilimini düşürmeyi önermişlerdir. Vertzoni ve diğerleri [28] tarafından ise, açlık ve tokluk durumlarındaki midenin durumunu insanlardan alınan örneklerle incelemiş ve FaSSGF, FaSSGF-v2 ve FeSSGF ortamlarını önermiştir. Çizelge 2.3’te açlık ve tokluk durumlarındaki mide ortamlarının içerik ve özellikleri gösterilmektedir.

Çizelge 2.3. Mide ortamlarının açlık ve tokluk durumlarındaki içeriği ve özellikleri [19]

İçerik	SGF	FaSSGF	FaSSGF v2	FeSSGF
Lesitin (mM)	-	0,02	0,02	-
Sodyum taurokolat (mM)	-	0,08	0,08	-
Pepsin (mg/ml)	3,2	0,1	0,1	-
Asetik asit (mM)	-	-	-	17,1
Sodyum asetat (mM)	-	-	-	29,8
Sodyum klorür (mM)	34,2	34,2	68	237
Hidroklorik asit (mM)	71,0	25,1	qs	-
Süt/Tampon	-	-	-	1/1
Ortam Özellikleri				
pH	1,2	1,6	1,6	5,0
Osmolalite (mOsm/kg)	-	120,7±2,5	-	~400
Tampon kapasitesi (mmol/l/ΔpH)	-	-	-	25

İnce bağırsak

Simüle edilmiş bağırsak ortamı (SIF) USP’de tanımlanmıştır ve pH değeri 6,8’dir. Dressman ve diğerleri [20] ve Jantratid ve diğerleri [28] tarafından yapılan çalışmalarla bu ortamların fizyolojik özellikleri tanımlanmıştır. Çizelge 2.4’te açlık ve tokluk durumlarındaki ince bağırsak ortamlarının içerik ve özellikleri sunulmaktadır:

Çizelge 2.4. İnce bağırsak ortamlarının açlık ve tokluk durumlarındaki içeriği ve özellikleri [20]

İçerik	SIF	FaSSIF	FaSSIF- v2	FeSSIF	FeSSIF- v2
Lesitin (mM)	-	0,75	0,2	3,75	2
Sodyum taurokolat (mM)	-	3	3	15	10
Gliserol monooleat (mM)	-	-	-	-	5
Sodyum oleat (mM)	-	-	-	-	0,8
Pankreatin (mg/ml)	10	-	-	-	-
Asetik asit (mM)	-	-	-	144,0	-
Maleik asit (mM)	-	-	19,1	-	55,0
Monobazik potasyum fosfat (mM)	50,0	28,7	-	-	-
Sodyum klorür (mM)	-	-	68,6	-	125,5
Potasyum klorür (mM)	-	103,3	-	203,9	-
Sodyum hidroksit (mM)	15,4	qs	34,8	qs	81,7
Ortam Özellikleri					
pH 5,8	6,8	6,5	6,5	5,0	5,8
Osmolalite (mOsm/kg)	-	270±10	180±10	635±10	390±10
Tampon kapasitesi (mmol/l/ΔpH)	-	-	-	-	25

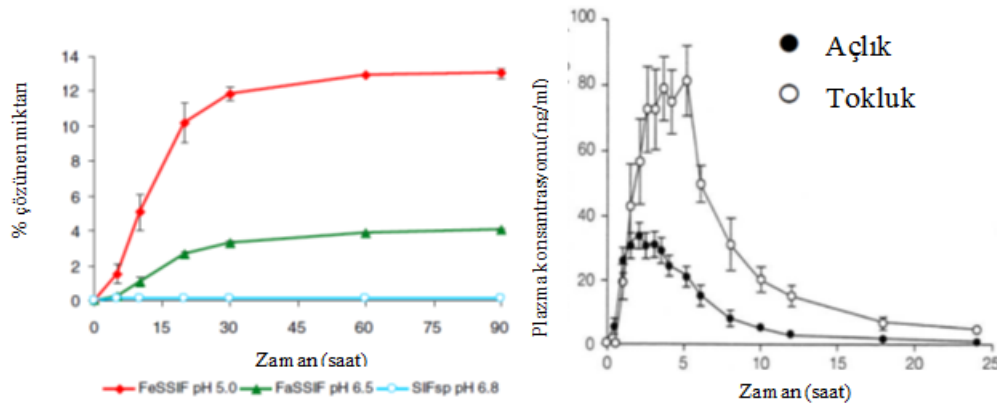
Kalın Bağırsak

Açlık ve tokluk durumlarındaki kalın bağırsak ortamlarının içerik ve özellikleri Çizelge 2.5'te sunulmaktadır.

Çizelge 2.5. Kalın bağırsak ortamlarının açlık ve tokluk durumlarındaki içeriği ve özellikleri [20]

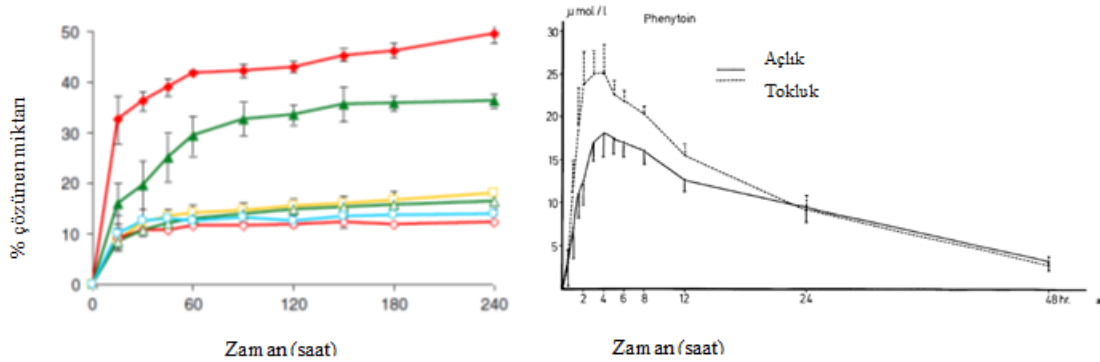
İçerik	FaSSCoF	FeSSCoF
Lesitin (mM)	0,3	0,5
Safra tuzu ekstresi (mM)	0,15	0,6
Palmitik acid (mM)	0,1	0,2
Albumin (mg/ml)	3	3
Sodyum klorür (mM)	-	34
Glikoz (mg/ml)	-	14
Tris-aminometan (mg/ml)	5,5	3,7
Maleik asit (mg/ml)	8,8	3,5
Sodyum hidroksit (mM)	qs	qs
Ortam Özellikleri		
pH 5,8	7,8	6,0
Osmolalite (mOsm/kg)	196	207
Tampon kapasitesi (mmol/l/ Δ pH)	16	15

Örneğin, BCS Sınıf 2'ye ait nötr bir ilaç olan danazolün biyoyararlanımı, yiyeceklerle birlikte alınması durumunda 4 kat artar. Yapılan in vitro çözünme hızı testlerinde de ince bağırsaktaki tokluk durumunu taklit eden (FeSSIF-Fed State Simulated Intestinal Fluid) ortamda elde edilen çözünme hızı sonuçlarının in vivo verileri desteklediği görülmüştür [7]. Danazolün biyoyararlanımı üzerinde yiyecek etkisi Şekil 2.4'te gösterilmektedir.



Şekil 2.4. Danazolün biyoyararlanımına yiyecek etkisi [22, 31]

BCS Sınıf 2'ye ait, zayıf baz özellik gösteren bir etkin madde olan fenitoinin çözünme hızı üzerinde safra tuzlarının etkisi gösterilmiştir. Klasik test ortamlarında 4 saatte ancak %12-20 arası bir salım sağlanırken, bu oran FaSSIF'te %36, FeSSIF'te ise %50 civarındadır. İn vitro ortamda gözlenen bu durum, in vivo verilerle de desteklenmiş ve fenitoinin biyoyararlanımının yiyeceklerle birlikte alımda arttığı gösterilmiştir [7]. Fenitoinin biyoyararlanımı üzerinde yiyecek etkisi Şekil 2.5'te gösterilmektedir.



Şekil 2.5. Fenitoinin biyoyararlanımına yiyecek etkisi [22, 32]

Zor çözünen ilaçlar için çözünürlük ve çözünme hızında etkili tek faktör pH olmadığı için, biyoyumlu ortamları kullanıldığında in vivo kestirimler ve değerlendirmeler açısından daha kesin sonuçların alınacağı açıktır. Sarısaltık ve Teksin'in 2010 yılında BCS Sınıf 2 bir molekül olan flurbiprofen üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada da zayıf asit özelliğinde bir molekül olan flurbiprofenin sodyum taurakolat ve lesitin içeren biyoyumlu ortamlarda klasik ortamlara göre daha yüksek oranda çözündüğü gözlenmiştir. Özellikle BCS Sınıf 2'deki zayıf asidik ilaçların emilim bölgesi olan ince bağırsaklarda yüksek

çözünürlükte olması ve katı oral dozaj şeklinden hızlı çözünmesi bu tarz ilaçların BE çalışmasından vazgeçilebileceğini düşündürmektedir [33].

Biyoyumlu çözünme ortamlarının hazırlanışı

Biyoyumlu çözünme ortamları özel yöntemlerle hazırlanır. Bu ortamların hazırlanışında sodyum tauroklat ve lesitini çözmek için organik çözücüler kullanılır. Hazırlanışları uzun ve zahmetlidir. Ayrıca, klasik yöntemlerle hazırlanan ortamların yüzey gerilimi, viskozite ve misel boyutları açısından kalitesi değişkenlik gösterebilir.

Biorelevant.com firması tarafından geliştirilen FaSSIF FeSSIF FaSSGF Powder (eski adıyla SIF® (Simulated Intestinal Fluid) Powder), sodyum taurokolat ve lesitin içeren liyofilize bir toz karışımıdır ve biyoyumlu ortam hazırlanmasını oldukça kolaylaştırmaktadır. Açlık ve tokluk durumları için belirlenmiş olan tampon çözeltilere, belirli miktarda bu biyoyumlu çözünme ortam içeriği katılarak hazırlanır [34].



Resim 2.1. FaSSIF FeSSIF FaSSGF Powder

FaSSIF FeSSIF ve FaSSGF Powder'ın avantajları şu şekilde sıralanabilir [34] :

1- Yüksek kalite:

Biyoyumlu çözünme ortamları hazırlanırken kullanılan saflık derecesi ürün kalitesini doğrudan etkiler. Biyoyumlu ortam hazırlığında yüksek kalite ve saflıktaki yardımcı maddeler kullanılmaktadır.

2- Kolay kullanım:

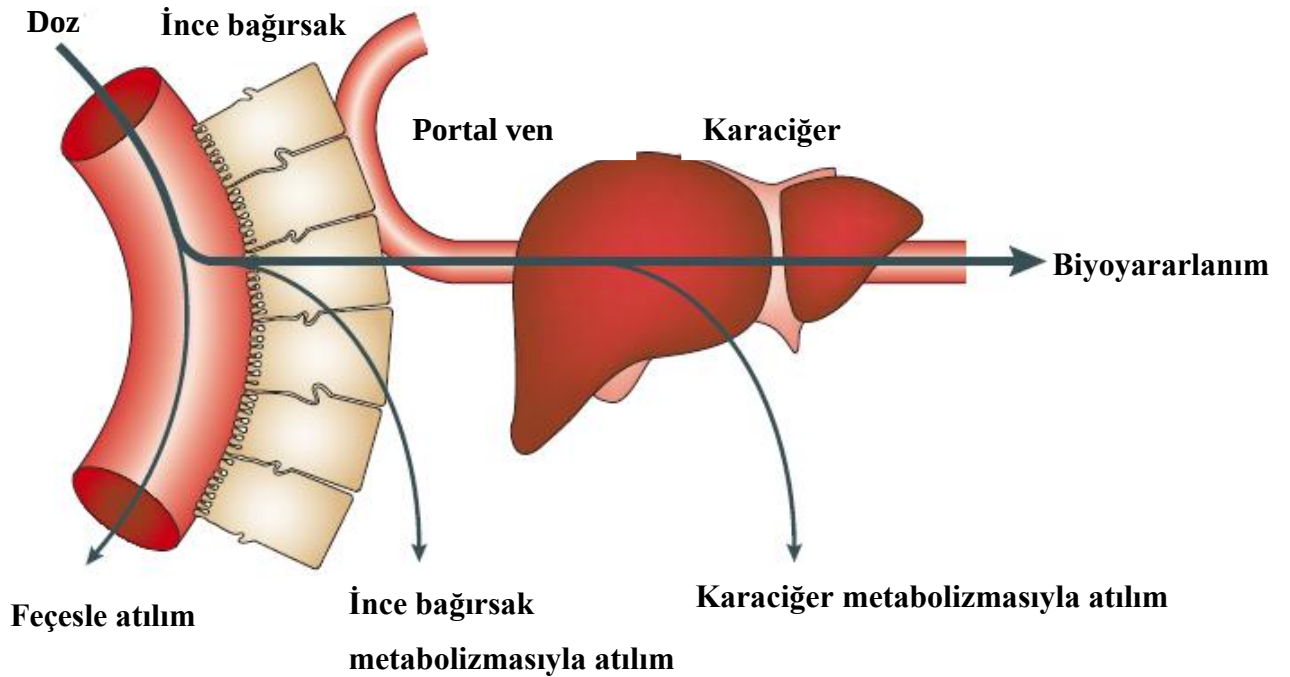
FaSSIF ve FeSSIF ortamlar aynı liyofilize toz karışım kullanılarak hazırlanır. Belirli miktarlardaki liyofilize toz karışımı, açlık ve tokluk durumları için tanımlanmış tampon çözeltilerde çözülür. Küçük veya büyük miktarlarda ortam kısa sürede hazırlanabilir. Ortamlar kısa sürede hazırlanabildiği için sterilizasyon ve saklama problemleri ortadan kalkmış olur.

3- Standardizasyon:

Toz karışım belli standartlara göre hazırlandığı ve gerekli kalite kontrol testlerinden geçtiği için, hazırlama protokolü takip edildiği sürece aynı standartlarda biyoyoumlu ortam elde edilmesi mümkün olur. Bu karışımlarla standart bir misel boyutu sağlanmaktadır.

2.4. Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi (BCS)

Vücuda giren bir ilaç, sistemik dolaşıma geçene kadar Resim 2.2’de gösterildiği gibi mide ve bağırsaklarda değişik yollar izler [12].



Resim 2.2. Oral yolla alınan bir ilacın mide-bağırsak kanalında izlediği yol [35]

Buna göre, bir ilacın mide-bağırsak kanalından geçiş süresi boyunca dozaj şeklinden çözünmesi/salınması ve emiliminin gerçekleşmesi gereklidir.

Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi (BCS), ilaçları sudaki çözünürlük ve ince bağırsaktaki geçirgenlik (permeabilite) ve dozaj şeklinin in vitro çözünme hızı özelliklerine göre sınıflandıran bir bilimsel yaklaşımdır [36]. BCS, otoritelerce tanınan ve özellikle ruhsatlandırma çalışmalarında biyomuafiyet açısından başvurulanan bir sistem olup, ilaç endüstrisi açısından oldukça önemlidir.

BCS'e göre, hemen salım yapan katı ilaç şekillerinin emilim hız ve miktarını belirleyen 3 ana etmen çözünürlük, permeabilite ve dozaj şeklinden çözünme hızıdır. Bu etmenler, doz sayısı (D_o), çözünme sayısı (D_n) ve emilme sayısı (A_n) ile ifade edilir. Bu değerler, mide-bağırsak kanalından ilaç emiliminin temellerini oluşturan fizyokimyasal ve fizyolojik parametreler temel alınarak belirlenmiştir [8].

BCS'e göre ilaçlar, çözünürlük ve permeabilite özelliklerine göre Çizelge 2.6'da gösterildiği gibi 4 sınıfa ayrılır:

Çizelge 2.6. BCS'e göre ilaçların sınıflandırılması

	Yüksek Çözünürlük	Düşük Çözünürlük
Yüksek Permeabilite	Sınıf 1	Sınıf 2
Düşük Permeabilite	Sınıf 3	Sınıf 4

- **BCS Sınıf 1 İlaçlar**

BCS Sınıf 1 ilaçların çözünürlüğü ve emilim oranları yüksektir. Bu ilaçların emilmesinde hız belirleyici adım çözünmedir. Eğer çözünme çok hızlıysa, mide boşalma hızı, hız belirleyici adım olur. Metoprolol, propranolol, diltiazem, verapamil, darifenasin gibi ilaçlar BCS Sınıf 1 ilaçlara örnektir. Bu ilaçlar, gastrointestinal kanalda dayanıklı olma, formülasyonda kullanılan yardımcı maddelerin emilim üzerinde etkisinin olmaması, ilacın terapötik indeksinin dar olmaması ve ilaç emiliminin ağızda gerçekleşmemesi gibi koşulları sağladıkları takdirde biyoeşdeğerlik çalışmalarından muaf tutulabilmektedir [35].

- **BCS Sınıf 2 İlaçlar**

Çözünürlüğü 100 µg/mL'den düşük olan ilaçların in vivo çözünmesinde sorun olabileceği belirtilmektedir [35]. BCS Sınıf 2 ilaçların çözünürlükleri düşüktür, ancak permeabiliteleri yüksek olduğu için bağırsak mukozasından kolayca geçebilirler. Bu ilaçların oral biyoyararlanımında hız belirleyici adım in vivo çözünme hızıdır [37].

- **BCS Sınıf 3 İlaçlar**

BCS Sınıf 3 ilaçlar, yüksek çözünürlük gösteren ilaçlardır. Bu ilaçların emilimi formülasyondan bağımsız olup membran geçirgenliği ve fizyolojik özelliklerden etkilenirler [38].

- **BCS Sınıf 4 İlaçlar**

Düşük çözünürlük ve düşük permeabilite özelliği gösteren ilaçlardır. Bu ilaçlar yüksek değişkenlik gösterirler ve genellikle mide-bağırsak kanalında iyi emilim göstermezler [38].

2.4.1. Temel BCS parametreleri

Etkin maddenin çözünürlüğü

BCS'e göre, yüksek çözünürlük sağlanabilmesi için, ilacın piyasadaki en yüksek dozunun 250 mL veya daha az miktardaki çözünme ortamında, 37°C'de, pH 1-7,5 aralığında çözünebilmesi gereklidir. İlacın çözünürlük ve çözünme özellikleri incelenirken doz numarası (D_n) parametresinden yararlanılır (Eşitlik 2.4). Doz sayısının 1'den küçük olması ilacın çözünürlüğünün yüksek olduğunu gösterir. Doz (mg)/çözünürlük (mg/mL) oranı, dozun tamamını çözmek için gerekli sıvı miktarını (mL) tanımlar. Bu değer mide-bağırsak kanalı sıvılarının hacminden yüksek ise, çözünmenin ve dolayısıyla emilimin tamamen gerçekleşmeyeceği söylenebilir. SUPAC kılavuzunda, iyi çözünürlük değeri olarak belirlenmiş oran 250 mL'dir [39].

$$D_0 = M / C_s V_0 \quad (2.4)$$

M: Doz (mg)

V_0 : Hacim (250 mL)

C_s : Çözünürlük (mg/mL)

Etkin maddenin permeabilitesi

Permeabilite, ilacın mide bağırsak sıvılarından geçebilme özelliğidir. BCS'e göre, bir ilacın yüksek permeabilite özelliği gösterebilmesi için FDA'e göre %90 ve daha büyük oranda, EMA'ya göre ise %85 ve daha yüksek oranda emilmesi gerekmektedir. Permeabilite, insanda yapılan mutlak biyoyararlanım ve kütle denkliği çalışmaları, hayvan deneyleri ve in vitro hücre kültürü çalışmalarıyla hesaplanabilmektedir [39].

Bir ilacın emilebilmesi için çözünmüş olması gerekir. Çözünme sayısı, ilacın vücuttaki ortalama kalış süresinin çözünme süresine oranıdır. Bu oranın 1'den büyük olması ilacın çözünürlüğünün yüksek olduğunu gösterir. Çözünme sayısı Eşitlik 2.5'te gösterilmektedir:

$$\text{Çözünme sayısı} = (3D/r^2) / (C_s/\rho) = t_{\text{res}} / t_{\text{Diss}} \quad (2.5)$$

t_{res} : İlacın vücutta kalış süresi (sn)

t_{Diss} : İlacın çözünme süresi (sn)

D : Difüzyon katsayısı (cm^2/sn)

r : İnce bağırsağın yarıçapı (cm)

C_s : Çözünürlük (mg/mL)

ρ : Yoğunluk (mg/mL)

Emilme sayısı ise, permeabilite değerlendirmesindeki temel parametredir ve ilacın vücuttaki ortalama kalış süresinin Emilme süresine oranıdır. Bu oran, efektif permeabilite ve ince bağırsağın çapına bağlıdır. Emilme sayısı Eşitlik 2.6'da gösterilmektedir:

$$\text{Emilme sayısı: } P_{\text{eff}} \times t_{\text{res}} / R = t_{\text{res}} / t_{\text{Diss}} \quad (2.6)$$

P_{eff} : Efektif permeabilite ($\text{cm}/\text{sn} \times 10^4$)

t_{res} : İlacın vücutta kalış süresi (sn)

r: İnce bağırsağın çapı (cm)

İn vitro çözünme hızı

BCS'e göre, hızlı çözünme hızı özelliği gösteren ilaçlar, USP Cihaz 1 ile 100 rpm veya USP Cihaz 2 ile 50 rpm hızda, 900 mL hacimde, pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 ortamlarında 30 dakika içinde %85 çözünme sağlarlar [40]. Hızlı salımlı ilaçlar için çözünme hızı testlerinde, 10, 15, 20, 30 ve 45. dakikalar önerilmektedir [23].

2.4.2. BCS'e göre in vitro çözünme ortamının seçimi

BCS Sınıf 1 ilaçlar

BCS Sınıf 1 ilaçların çözünürlükleri yüksektir ve çözünme ortamından bağımsızdır. Sınıf 1 ilaçlar, FDA'e göre 30 dakika içinde çözünme ortamında %85 çözünme oranına ulaşmalıdır. Bu ilaçlar ayrıca mide bağırsak kanalında iyi emilirler. Bu ilaçların çözünme hızı testlerinde klasik in vitro çözünme ortamları kullanılır. Bu ilaçlar oral uygulama sonrası genelde midede dağıldıkları için, SGF kullanımı uygundur. Alternatif olarak ince bağırsak pH'sını taklit eden SIF ortamı kullanılabilir [35].

BCS Sınıf 2 ilaçlar

BCS Sınıf 2 ilaçların çözünürlükleri düşük olmasına rağmen emilimleri yüksektir. Bu nedenle bu ilaçların emiliminde hız belirleyici adım in vivo çözünme hızıdır. Bu ilaçların çözünme hızı testlerinde yüzey etkin madde içeren açlık ve tokluk durumlarını taklit eden mide ortamları, açlık ve tokluk durumlarını taklit eden biyoyoumlu bağırsak ortamları veya sentetik yüzey etkin madde (SLS, polisorbat vb) içeren ortamlar kullanılabilir [35].

BCS Sınıf 3 ilaçlar

Bu moleküllerin çözünürlükleri yüksek olmasına rağmen, emilimler düşük olduğu için biyoyararlanımları iyi değildir. Emilimde hız belirleyici adım, Sınıf 1 ilaçlarda olduğu gibi dozaj şeklinden salım hızı ve mide boşalmasıdır. Bu ilaçlar için klasik ortamların kullanılması yeterlidir [4]

BCS Sınıf 4 ilaçlar

Sınıf 4 ilaçların hem çözünürlükleri hem emilimleri düşüktür. Bu ilaçların çözünme hızı testlerinde yüzey etkin madde içeren klasik ortamlar, SGF veya SIF kullanılabilir [35].

2.4.3. BCS Alt Sınıflandırma

BCS Sınıf 2 ve BCS Sınıf 4'e ait ilaçların in vitro ve in vivo çözünme hızları, ince bağırsaktaki in vivo koşulların yanında, etkin maddenin asidik veya bazik özellik göstermesine, dozaj şeklinin bu ortamlardaki çözünürlüğüne ve ilacın formülasyonuna bağlıdır. Tsume ve diğerleri [38], 2014 yılında yayınladıkları çalışmalarında, BSC Sınıf 2 ve BCS Sınıf 4 ilaçlar için asidik ve bazik özelliklere dayalı bir alt sınıflandırma sistemi önermektedirler. Bu sisteme göre etkin maddeler fizyolojik pH aralığında, asidik, bazik veya nötral özellik göstermelerine göre gruplanırlar. BCS Sınıf 2a ve BCS Sınıf 4a'ya ait ilaçlar, zayıf asit özelliği gösteren pK_a 'ları 4-5 arasında değişen karboksilik asitlerdir. Bu moleküller, midede düşük, ince bağırsakta yüksek çözünürlük gösterirler. Bu ilaçlar, pH 6,5'daki permeabilite özelliklerine göre BCS Sınıf 2a veya BCS Sınıf 4a'ya dahil edilirler. Bu ilaçların plazma düzeyleri, BCS Sınıf 1 ilaçlarda olduğu gibi, formülasyondan ziyade, mide boşalması ve ince bağırsaktaki pH değişimlerine bağlı olarak farklılık gösterir. BCS Sınıf 2b'ye ait ilaçlar ise, zayıf baz özelliği gösterirler. Bu ilaçlar, midedeki asidik koşullarda yüksek çözünürlük gösterirken, ince bağırsağa geçişte mide-bağırsak kanalındaki fizyolojik koşullara ve formülasyon özelliklerine bağlı olarak çökebilirler. BCS Sınıf 2c'ye ait ilaçlar, fizyolojik pH'da iyonlaşmadıkları için mide-bağırsak kanalındaki pH değişimlerinden etkilenmezler. Bu ilaçların çözünme hızını, ortamda bulunan yüzey etkin maddelerle lipidlerin varlığı değiştirir [38]. Çizelge 2.7'de BCS alt sınıflandırma sistemine göre ilaçların sınıflandırılması gösterilmektedir.

Çizelge 2.7. BCS alt sınıflandırma sistemi

BCS Alt Sınıflandırma	pH 2'deki çözünürlük	pH 6,5'deki çözünürlük	Permeabilite
1	Yüksek	Yüksek	Yüksek
2a	Düşük	Yüksek	Yüksek
2b	Yüksek	Düşük	Yüksek
2c	Düşük	Düşük	Yüksek
3	Yüksek	Yüksek	Düşük
4a	Düşük	Yüksek	Düşük
4b	Yüksek	Düşük	Düşük
4c	Düşük	Düşük	Düşük

2.5. Bilgisayar Simülasyonlarıyla Farmasötik Değerlendirmeler

2.5.1. Giriş

Biyofarmasötik, dozaj şekillerinin biyolojik yanıt üzerindeki bütün etkileriyle (emilim, dağılım, metabolizma ve atılım) dozaj şekli içindeki etkin maddenin fizikokimyasal özelliklerini ve dozaj şeklinin hazırlanış yönteminin bu yanıt üzerindeki olası etkilerini inceler. Bir oral dozaj formunun in vivo performansının doğru olarak tahmin edilebilmesi ilaç geliştirilmesi açısından çok önemlidir. Gastrointestinal Simülasyon Teknolojisi (GST) bir dozaj formunun çözünme, salım, emilim, dağılım, metabolizma ve atılım süreçlerini modellemeyi ve sonrasında dozaj şeklinin vitro özellikleriyle in vivo performansı arasında ilişki kurmayı hedefler. Temel amaç hem masraflı hem de etik olarak tartışmalı hayvan ve insan deneylerini azaltmaktır [41, 42].

2.5.2. Farmakokinetik modelleme

Farmakokinetik modelleme, etkin maddenin vücut içinde gerçekleştirdiği çözünme, salım, emilim, dağılım, metabolizma ve atılım proseslerinin zamana bağlı olarak matematiksel denklemlerle tanımlanmasıdır. Bu modeller oluşturulurken, insanlar ve hayvanlar üzerinde yapılan intravenöz ve oral uygulamalar sonrası elde edilen veriler kullanılır. Preklinik aşamada, farklı in vivo çalışmalardan elde edilen veriler, yeni etkin maddelerin özelliklerinin anlaşılmasında ve optimize edilmesinde kullanılır. Klinik aşamada ise, farklı

deneklerden elde edilen veriler karşılaştırılarak, ilacın demografik ve fizyolojik karakterizasyonu yapılır [43].

2.5.3. Klasik modeller

Klasik modellerde, vücut kompartımanlar halinde tanımlanır; ancak bu kompartımanların anatomik ve fizyolojik özellikleri veya etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri dikkate alınmaz [44]. Bu modellerde, plazmayı temsil eden bir ana kompartıman bir veya iki tane periferik kompartımana bağlanır. Kompartımanlar arasındaki ilişki hız sabitleriyle matematiksel olarak kurulur. Bu nedenle bu modellerin verdiği bilgi sınırlıdır ve fizyolojik özellik taşımaz. Bu modellerden atılım ve dağılma hacmi gibi veriler elde edilir. Bu veriler, ilacın yarı ömrünü hesaplamada kullanılır [43].

2.5.4. Fizyolojik temelli farmakokinetik modelleme (PBPK)

Fizyolojik temelli farmakokinetik modellemede (physiologically-based pharmacokinetic modelling (PBPK modeling)) genel olarak, vücut fizyolojik kompartımanlara bölünür. Mide-bağırsak kanalı, seri bağlı kompartımanlar olarak düşünülür [20]. Anatomik ve fizyolojik olarak anlamlı kompartımanlarda kan akışı, organ büyüklüğü gibi sistemsel parametrelerle ilaca özgü bağlanma özelliği, permeabilite gibi parametreler birlikte ele alınır. Bu modellerde, fizyolojik parametreler kullanılarak, ilacın emilim, dağılım, metabolizma ve atılım gibi farmakokinetik özellikleri ve plazma doku dağılım profilleri tahmin edilir [45, 46, 47, 48].

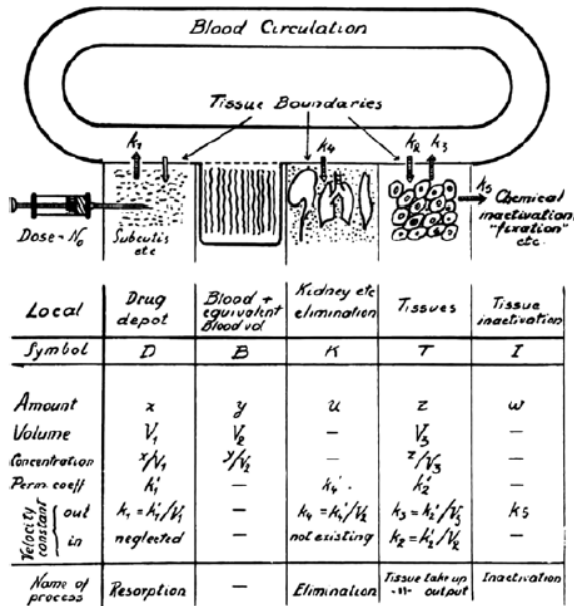
PBPK modellemede denklemler tanımlanırken, etkin maddenin fizikokimyasal ve farmakokinetik özellikleri ile doku ve organların fizyolojik özellikleri göz önüne alınır. Bu denklemlerin eş zamanlı olarak çözülmesiyle ilaç emilim modelleri oluşturulur. PBPK modelleme, bir etkin maddenin kandaki ve çeşitli dokulardaki konsantrasyonunu etkin maddenin fizikokimyasal özelliklerini, ilacın maruz kalacağı fizyolojik prosesleri, ilaç alım biçimi ve etki bölgesini göz önüne alarak tanımlamayı sağlar. PBPK modellemede emilim, dağılım, metabolizma ve atılım proseslerine etki eden faktörleri kullanılır. Simülasyonların tahmin gücünü artırmak için son yıllarda biyoyoumlu çözünme hızı testleriyle elde edilen veriler de bu programlarda kullanılmaktadır [28].

PBPK modellemesinin avantajları [48, 49]:

- PBPK modelleri dokulardaki etkin madde dağılımını gösterir. Dokulardaki toplam, serbest ve bağlı haldeki etkin madde konsantrasyonları tahmin edilebilir.
- Spesifik organlardaki atılım mekanizmaları konusunda fikir verir.
- Fizyolojik koşulları değiştirerek plazma konsantrasyonlarının (C_p) tahminini sağlar.
- Etkin madde yapısı ve farmakokinetik özellikler arasındaki ilişki konusunda bilgi sağlar.
- Hayvan modellerinin insana uyarlanabilmesine olanak sağlar.

Tarihçe

PBPK modellemenin ilk örneği 1937 yılında İsveçli fizyolog ve biyofizikçi Teorell'in kullandığı, dolaşım sistemi, depo ilaç, sıvı hacimleri, böbrek atılımı ve doku desaktivasyonunu simüle eden 5 kompartımanlı sistemdir [50]. Teorell'in ilaç moleküllerinin vücuttaki dağılımını gösteren orijinal çizimi Resim 2.3'te sunulmaktadır.



Resim 2.3. Teorell'in ilaç moleküllerinin vücuttaki dağılımını gösteren orijinal çizim [51]

Daha sonra, 1959 yılında Edelman ve Liebmman toplam vücut sıvısını plazma, lenf sıvısı, yoğun bağ ve kıkırdak doku, kemik sıvısı, hücreler arası ve hücre içi sıvı olarak gruplara ayırmıştır. 1968 yılında Bischoff ve Dedrick tarafından tiyopental ve metotraksat etkin maddelerinin farmakokinetik incelemelerinde kullanılmak üzere yapay böbrek geliştirilmiştir [52]. Bilişim sektöründeki ilerlemeleri takiben, 1979 yılında Chen ve Gross tarafından, anti-kanser ilaçlarda PBPK modelleri geliştirmesi ve o zamana kadar yapılan PBPK yapılmış olan tüm uygulamalar incelenmiştir. Bu makalede türler arası oranlama, hastalık durumunun kanser ilaçlarının farmakokinetiği üzerindeki etkileri ve kanser hücrelerinin çoğalmasındaki farmakokinetik uygulamalar gibi konular üzerinde çalışılması gerekliliği üzerinde durulmuştur [53].

1981 yılında John Wagner, dozlama, ilaç etkileşimleri, hayvan deneylerinden elde edilen sonuçlarla insanda farmakokinetik tahminler yapılması, farmakokinetik parametrelerin popülasyona göre incelenmesi, terapötik izleme ve farmakolojik etkinin yoğunluğunun incelenmesi gibi konular üzerinde durmuş ve PBPK uygulamalarının önemini vurgulamıştır [54].

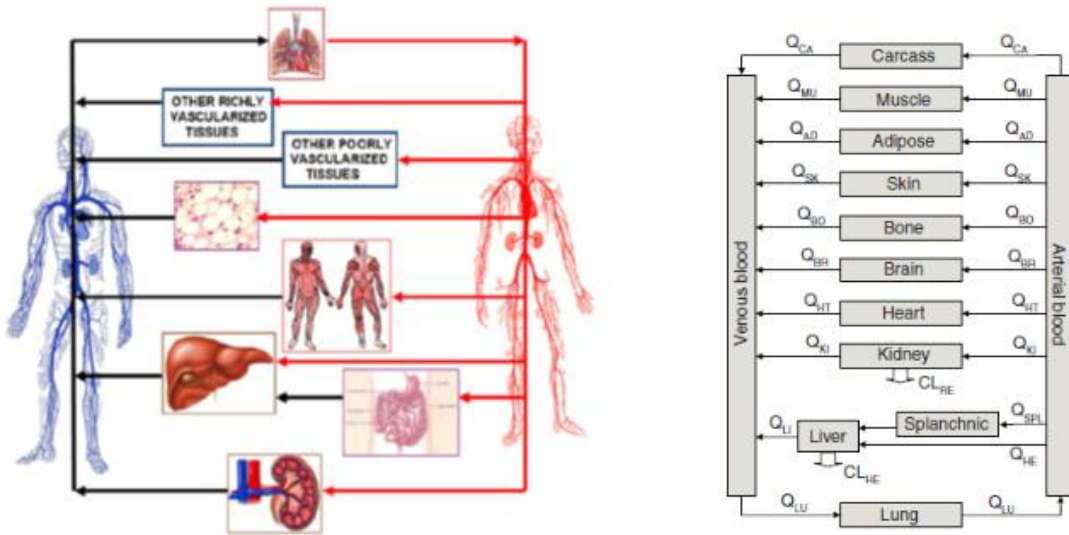
PBPK uygulamaları erken dönemlerinde matematiksel modellerin karmaşıklığı ve girdi olarak çok fazla veri gerekmesi nedeniyle sınırlı kalmıştır. Bu dönemlerde ilacın dokular içindeki dağılımını belirleyebilmek için yüksek miktarda hayvan deneyi yapılması gerekmektedir [55]. Ancak, in vitro ve in silico tahmin yöntemlerinin gelişmesiyle, PBPK modellerinde önemli bir parametre olan plazma-doku dağılım katsayıları tahmin edilmeye başlanmıştır. Böylece PBPK uygulamaları da gelişmiştir [56].

1998 yılında, mide-bağırsak kanalını detaylı olarak tanımlayan ve PBPK yaklaşımını uygulayan ilk ticari yazılım olan GastroPlus™ geliştirilmiştir. Simulations Plus firması tarafından geliştirilen bu yazılımda, etkin maddenin sudaki çözünürlüğü ve farmakokinetik özellikleri göz önüne alınarak ilacın mide-bağırsak kanalındaki hareketi, birbirine seri kompartımanlar aracılığıyla simüle edilmiştir. Bu verilerle, ilacın biyoyararlanımında emilim veya çözünürlük/çözünme hızının etkili olacağı belirlenebilmiştir [49].

GastroPlus™'ın yanında farklı firmaların geliştirdiği benzer prensiplerle çalışan Symcyp (9 kompartıman), PK-Sim (12 kompartıman), STELLA (4 kompartıman), GI-Sim gibi PBPK programları bulunmaktadır [57].

PBPK modellerin yapısı

Bir PBPK modeli, organ ve dokuları temsil eden seri bağlı kompartımanlardan oluşur. Bu kompartımanlar, vücuttaki yağ, kemik, beyin, bağırsak, kalp, böbrek, akciğer, karaciğer, kas, deri ve dalak gibi ana dokulara karşılık gelir. Karaciğer, böbrekler ve ince bağırsak gibi farmakokinetik proseslerde rol alan organlar ve fizyolojik/farmakokinetik olarak benzer özellik gösteren dokular sistemik dolaşımla (atardamar ve toplardamar sistemleri) birbirlerine bağlanmıştır [58]. Her kompartımanın doku hacmi ve kan akışı özellikleri diferansiyel denklemler yardımıyla tanımlanmıştır [47]. Bu denklemlerle, her kompartımandaki ilaç konsantrasyonu değişim hızı ve ilacın vücuttaki dağılımına etki eden faktörler kütle dengliği prensibiyle modellenir [58, 59]. Resim 2.4'te örnek PBPK modelinin yapısı sunulmaktadır:



Resim 2.4. Örnek PBPK modelinin yapısı [58, 59]

Dokular, perfüzyon hızı veya permeabilite sınırlayıcı olacak şekilde tanımlanabilir. Küçük, lipofilik moleküllerin emiliminde dokuya ulaşan kanın akış hızı (perfüzyon hızı) hız belirleyici adımken, büyük polar moleküller için doku membranlarından geçiş yani permeabilite hız belirleyici adımdır. Atılımın sadece böbrekler ve karaciğerden olduğu varsayılır [41].

PBPK modeller oluşturulurken aşağıdaki özellikler dikkate alınır:

- Anatomik özellikler: Organ ve doku hacimleri

- Fizyolojik özellikler: Kan akış hızları, enzim reaksiyon parametreleri
- Transport özellikleri: Membran permeabiliteleri
- Termodinamik özellikler: İlaç-protein etkileşimleri
- Mide bağırsak kanalının içeriği
- Kompartımanlar arası ilaç geçişi ve mide-bağırsak kanalının hidrodinamik özellikleri
- Permeabilite ve taşıyıcı etkisi
- Bağırsakta gerçekleşen metabolik faaliyetler

PBPK modellemesinin kullanım alanları

İlaç emiliminin modellenmesi, yeni molekül bulunması, pre-klinik araştırmalar ve klinik araştırmalar alanlarında kullanılabilir. Yeni ilaç molekülü bulunması sırasında, sentezlenen ve fizyokimyasal özellikleri tanımlanan ilaç moleküllerinin oral emiliminin simüle edilmesi en uygun ilaç molekülünün seçilebilmesine yardımcı olur [46].

Pre-klinik aşamada, in vitro ve in siliko verilerle birlikte, hayvanlardan elde edilen veriler kullanılarak insandaki ilaç davranışı tahmin edilmeye çalışılır. PBPK modelleri kullanılarak fare, sıçan, köpek ve maymun gibi farklı türlerden elde edilmiş veriler, in vitro verilerle birlikte kullanılarak insandaki ilaç emilimi tahmin edilebilir [46].

Bu modellerden elde edilen veriler, klinik araştırmalar için temel oluşturur ve klinik araştırmalardan elde edilen verilerle geliştirilebilir. Yiyecek etkisi, taşıyıcı ve enzim etkisi, ince bağırsak metabolizması gibi ilaç üzerinde etkili olabilecek faktörler modeller sayesinde incelenip, elde edilen verilerle geliştirme çalışmalarına yön verilebilir [46]. PBPK, anatomik, fizyolojik ve fizyokimyasal parametreler içeren mekanistik bir modelleme aracı olarak emilim [60, 61, 62], klirens [63], dağılma hacmi [64], doku dağılımı [65, 66, 67, 68] ve ilaçlar arası etkileşim [68, 69, 70, 71, 72, 73] tahmininde kullanılmıştır. İlaç geliştirmesinde Faz II aşamasında ise salımı farklı formülasyonlar veya

in vitro in vivo korelasyon geliştirme çalışmalarında PBPK modellemeden yararlanılır [46].

FDA tüm farmasötik ürünlerin geliştirilmesinde tasarım ile kalite (quality by design, QbD) tekniklerinin kullanılmasını önermektedir [74]. Örneğin salım profilleri ile çözünme hızı arasındaki ilişkiyi ortaya koyan modeller, QbD içeren ilaç başvuruları oluşturulması konusunda yardımcı niteliktedir [75].

2.6. İn vitro in vivo korelasyon (IVIVC) geliştirilmesi

Biyofarmasötik çalışmalarda, in vitro çözünme hızı ile in vivo emilme arasında ilişki kurabilmek çok önemlidir. Böyle bir ilişki kurulabildiği takdirde ilaç geliştirme süresi kısalmır, kaynaklar daha ekonomik kullanılabilir ve ürün kalitesi artar. IVIVC, yeni ilaç geliştirme çalışmalarında insan deneylerinin azaltılmasında veya biyomuafiyet sağlanması için in vivo biyoyararlanımın değerlendirilmesinde kullanılır. IVIVC'nin amacı, matematiksel bir model aracılığıyla, ilacın in vitro özelliği ve in vivo performansı arasında bir ilişki kurabilmektir [76].

IVIVC, FDA'de bir dozaj formunun in vitro özelliğini kullanarak ile in vivo yanıt arasındaki ilişkiyi tanımlayan matematiksel model olarak tanımlanır. Burada in vitro özellik ilacın çözünmesi veya salımı; in vivo özellik ise plazma ilaç konsantrasyonu veya emilen ilaç miktarıdır. IVIVC'nin USP tanımı ise bir dozaj formunun biyolojik bir özelliği ile fizikokimyasal bir özelliği arasında kurulan ilişkidir. Buradaki fizikokimyasal özellik, in vitro disolüsyon profili iken biyolojik özellik AUC veya C_{max} 'tır [77].

IVIVC:

- Biyomuafiyet sağlanmasında
- Çözünme hızı metodu spesifikasyonları belirlenmesinde veya valide edilmesinde
- Kalite kontrolünde ve uygun formülasyon seçilmesinde yardımcı olur.
- Ana amaç, insandaki çalışmalarla, başlangıç ya da SUPAC değişikliklerinde biyoeşdeğerlik çalışmalarını en aza indirmektir.

IVIVC kurulabilmesi için:

- İlaç salımı veya çözünme hızının hız belirleyici adım olması (ER formülasyon, BCS Sınıf 2 ilaçlar),
- İn vitro disolüsyon metodunun in vivo tahminlere uygun olması,
- Plazma konsantrasyonu-zaman eğrilerinin kullanılarak gerçeği yansıtan in vivo çözünme-zaman eğrilerinin elde edilmesi gereklidir.

IVIVC kurulabilmesi için ilaç salımı veya çözünme hızının hız belirleyici adım olması nedeniyle, bu korelasyon uzun salım yapan veya zor çözünen (BCS Sınıf 2) ilaçlarda kullanılır. IVIVC, mide boşalması veya permeabilitenin emilmeyi kontrol ettiği durumlar için tasarlanmamıştır [78]. Çizelge 2.8’de hızlı salım yapan ilaçlar için BCS’e göre IVIVC kurulabilmesi değerlendirilmiştir.

Çizelge 2.8. Hızlı salım yapan ilaçlar için BCS’e göre IVIVC değerlendirmesi

BCS Sınıfı	Çözünürlük	Permeabilite	Emilim kontrolü	IVIVC kurulabilmesi olasılığı
Sınıf 1	Yüksek	Yüksek	Mide boşalması	Çözünme hızı mide boşalmasından yavaşsa IVIVC kurulabilir
Sınıf 2	Düşük	Yüksek	Çözünme hızı	İn vitro ve in vivo çözünme hızları benzerse IVIVC kurulabilir
Sınıf 3	Yüksek	Düşük	Permeabilite	Hız belirleyen adım Emilim olduğu için IVIVC kurulamaz
Sınıf 4	Düşük	Düşük	Molekül özelliğine göre	Sınırlı IVIVC olasılığı, duruma göre değerlendirilir

2.6.1. Korelasyon türleri

IVIVC’nin A, B, C, çoklu C ve D olmak üzere 4 türü vardır [79, 80].

A düzey korelasyon

İn vitro çözünme hızı ve in vivo emilme hızı arasında kurulan birebir korelasyonudur. Çözünme hızı ve plazma verilerindeki tüm noktalar kullanılarak yapılır. İn vitro verilere dayanılarak in vivo emilme eğrisi tahmin edilir.

İn vitro çözünen miktarı ve in vivo emilme miktarı arasında birebir ilişki vardır.

B düzey korelasyon

Ortalama in vitro çözünme hızı (MDT in vitro) ile in vivo yaşam süresi (MRT in vivo) kıyaslanır. Gerçek in vivo plazma değerlerini tanımlamaz.

C düzey korelasyon

Tek bir çözünme hızı noktası ($t_{50\%}$ ve $t_{90\%}$ gibi) tek bir farmakokinetik parametre ile kıyaslanır (AUC, t_{max} , C_{max} vb.)

Çoklu C düzey korelasyon

Bir veya birkaç farmakokinetik parametre ile çözünme hızında farklı zamanlarda çözünen madde miktarı arasındaki korelasyondur.

D düzey korelasyon

Kalitatif bir yöntemdir; ancak formülasyon geliştirmesinde yardımcı olarak kullanılabilir.

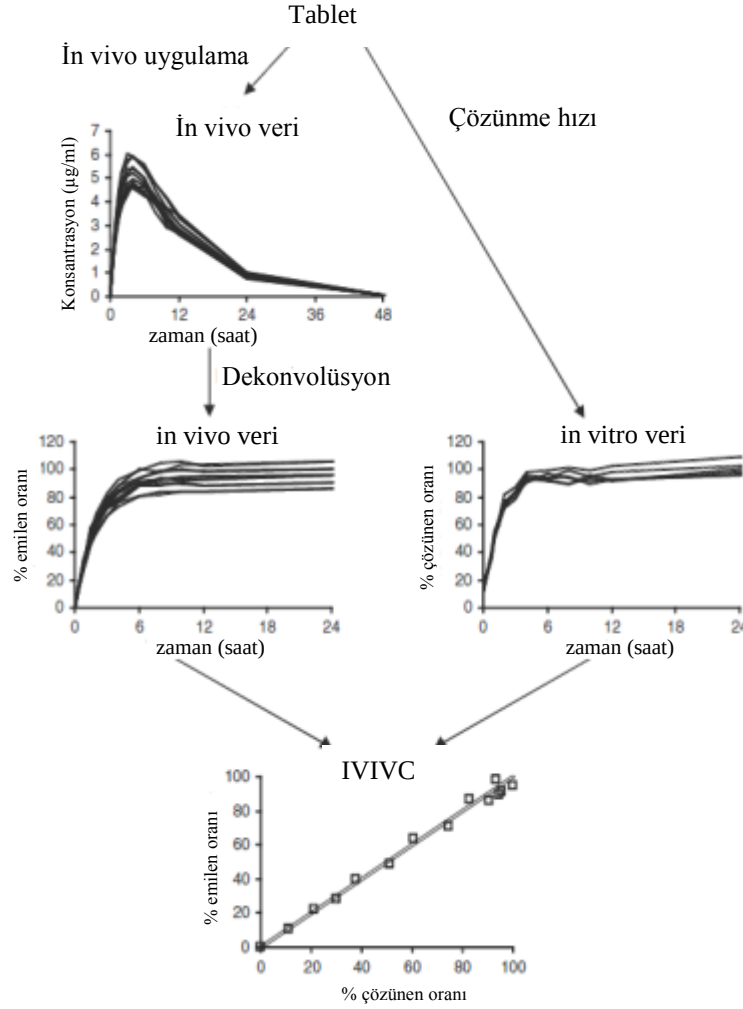
2.6.2. Korelasyon geliştirilmesi

A düzey bir korelasyon geliştirilmesinde aşağıdaki adımlar izlenir [81]:

- Farklı salım özellikleri (yavaş, orta ve hızlı salım gibi) olan formülasyonların geliştirilmesi,
- Bu formülasyonlar için in vitro çözünme hızı profillerinin elde edilmesi ve karşılaştırılması
- İn vivo plazma konsantrasyonu zaman profillerinin elde edilmesi

- Her bir formülasyon için uygun dekonvolüsyon tekniklerinden biri kullanılarak (modele bağımlı veya modelden bağımsız teknikler) in vivo emilme profillerinin elde edilmesi
- Her formülasyon için in vitro çözünme ve in vivo emilme ve arasında ilişki kurulması gereklidir.
- Bu aşamadan sonra IVIVC'nin validasyonu, içsel ve dışsal kriterlerin değerlendirilmesi ile yapılır. İçsel validasyon IVIVC modeli tanımlanırken kullanılan tüm verilerden hareketle ortaya konur. Dışsal validasyon ise verilerin ilavesiyle plazma konsantrasyonu zaman profillerinin konvülyasyon tekniği kullanılarak tanımlanması ile belirlenir. Çalışmalarda içsel validasyon genellikle yeterli bulunmakla birlikte, içsel validasyon kesin olmadığında, IVIVC dar terapötik indekse sahip ilaçlar için tanımlandığında, korelasyon geliştirilmesinde sadece iki farklı salım hızına sahip formülasyonlar kullanıldığında ve modelin daha geniş validasyonunun tanımlanmak istendiği durumlarda dışsal validasyona gerek duyulmaktadır. C_{maks} ve AUC ölçütleri için % kestirim hatası (%PE) değerleri hesaplanabilir.

IVIVC aşamaları, Resim 2.5'te özetlenmektedir:



Resim 2.5. İn vitro in vivo korelasyon (IVIVC) geliştirilmesi [81]

2.6.3. Korelasyon değerlendirilmesi

IVIVC, bir ilacın in vitro özelliği kullanılarak in vivo performansının tahmin edilmesinde kullanılır. Bu tahminin doğruluğu ve tutarlılığı çok önemlidir [76].

Korelasyon değerlendirmesi % kestirim hatasına göre yapılır. IVIVC'nin amacına ve ilacın terapötik indeksine göre içsel veya dışsal validasyon yapılması uygun olur. İçsel validasyon, geniş terapötik indekse sahip ilaçlarda ve 3 veya daha fazla salım özelliği gösteren formülasyon kullanılarak geliştirilmiş IVIVC'nin değerlendirilmesinde kullanılır. İçsel validasyonda, IVIVC geliştirilirken kullanılan farklı salım özelliğine sahip formülasyonlara ait AUC ve C_{max} için Eşitlik 2.7'deki gibi hesaplanan kestirim hatasının ortalama değerinin %10'dan küçük olması gereklidir. Ayrıca, farklı salım hızlarına sahip her bir formülasyon için de bu değer %15'i aşmamalıdır. Bu durum sağlamamazsa IVIVC

için içsel validasyon yapılamamış olur ve dışsal validasyon değerlendirmesi yapılması gerekir [76].

$$\% PE = [(gözlemlenen - kestirilen) / gözlemlenen] \times 100 \quad (2.7)$$

$$\% PE C_{max} = [(C_{max_{obs}} - C_{max_{pred}}) / C_{max_{obs}}] \times 100 \quad (2.7.a)$$

$$\% PE AUC = [(AUC_{obs} - AUC_{pred}) / AUC_{obs}] \times 100 \quad (2.7.b)$$

$C_{max_{obs}}$: Gözlemlenen C_{max} değeri

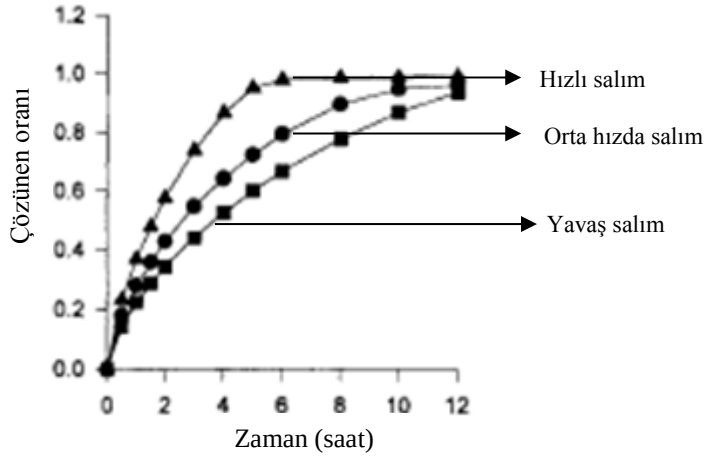
$C_{max_{pred}}$: Kestirilen C_{max} değeri

AUC_{obs} : Gözlemlenen AUC değeri

AUC_{pred} : Kestirilen AUC değeri

Dar terapötik indekse sahip ilaçlarda ve 2 farklı salım özelliği gösteren formülasyon kullanılarak geliştirilmiş IVIVC’de ise dışsal validasyon yapılır. Dışsal validasyonda, IVIVC geliştirirken kullanılmamış bir formülasyonun in vivo performansı tahmin edilir. Eşitlik 2.7’ye göre hesaplanmış kestirim hatasının %10’dan küçük olması dış tahminin uygunluğunu gösterir. %10-20 arası bir sonuç elde edilirse, ek çalışmalar yapılması gerekir. %20’den büyük bir kestirim hatası, IVIVC’nin tahmin gücünün yetersiz olduğunu gösterir [76].

Eddington ve diğerlerinin [82] uzun salımlı metoprolol tabletler üzerinde yaptığı in vitro in vivo korelasyon çalışmasında, yavaş, orta ve hızlı olmak üzere 3 farklı salım hızına sahip uzun salımlı tablet formülasyonu ve oral çözelti üzerinde çalışılmıştır. Tablet formülasyonların in vitro çözünme hızları 4 farklı yöntemle (palet yöntemi, pH 1,2 ve pH 6,8’de 50 rpm dönüş hızında; sepet yöntemi, pH 6,8’de 100 ve 150 rpm dönüş hızlarında) incelenmiştir. Bu yöntemlerin sonucunda çıkan eğriler f_2 hesabına göre değerlendirilmiş ve formülasyonlar arasındaki farkları en yüksek oranda gösteren (en düşük f_2 değerlerinin elde edildiği) sepet yöntemi, 150 rpm, pH 6,8, koşullarının kullanılmasına karar verilmiştir.

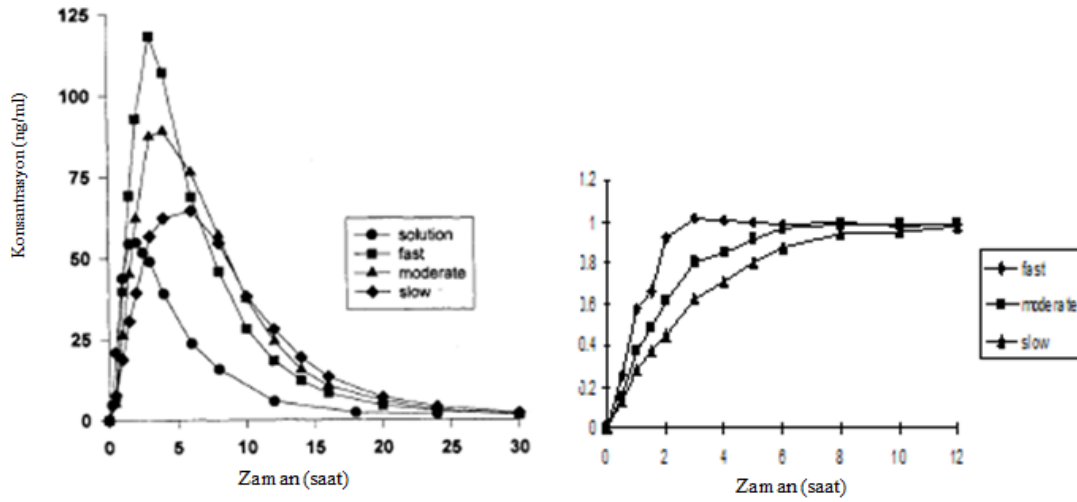


Şekil 2.6. Meteoprolol tabletler için sepet yöntemi, 150 rpm, pH 6,8 [82]

İn vivo çalışmalar, 7 sağlıklı gönüllü üzerinde gerçekleştirilmiş ve 48 saat boyunca kan örneği alınmıştır. İn vivo plazma konsantrasyonu-zaman verileri nümerik dekonvolüsyon yöntemi kullanılarak % emilen doz miktarı-zaman verilerine dönüştürülmüştür (Şekil 2.7). Bu yöntemde oral solüsyona ait farmakokinetik parametreler kullanılmıştır. Korelasyon modelleri oluşturulurken aşağıdaki formülasyon kombinasyonları kullanılmıştır:

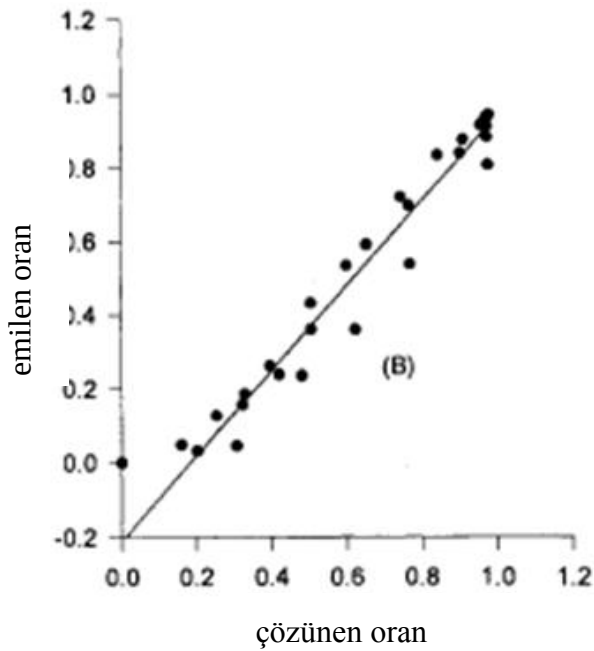
- Yavaş/orta hızda/hızlı salım
- Yavaş ve hızlı salım
- Orta hızda ve hızlı salım
- Yavaş ve orta hızda salım

Yapılan değerlendirmeler sonucu, en uygun sonuçların yavaş/orta hızda/hızlı salım formülasyonlarından oluşan korelasyon modeliyle elde edildiği gösterilmiştir (Şekil 2.7) [82].



Şekil 2.7. In vivo datanın dekonvolüsyon yöntemiyle % emilen oranına dönüştürülmesi [82]

Lineer regresyon analizi yapılarak emilen ve çözünen dozlar arasındaki ilişki bulunmuştur. Yapılan değerlendirmelerde yavaş/orta hızda/hızlı salım formülasyonlarıyla oluşturulan model ve sepet yöntemiyle (pH 6,8, 150 rpm) elde edilen çözünme hızı verileriyle oluşturulan IVIVC'nin tüm formülasyonlar için en uygun salım tahmini yaptığı belirlenmiştir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Metoprololün emilen ve çözünen oranları arasında kurulan IVIVC [82]

2.6.4. GastroPlus™

GastroPlus™ Simulations Plus (Lancaster, California, ABD) firması tarafından geliştirilmiş ve tüm vücudu simüle eden bir PBPK modelidir. GastroPlus™'ta, Yu ve Amidon [83] tarafından oluşturulmuş olan CAT (Compartmental Absorption and Transit) modeli temel alınarak ACAT (Advanced Compartmental Absorption Transit) modeli oluşturulmuştur.

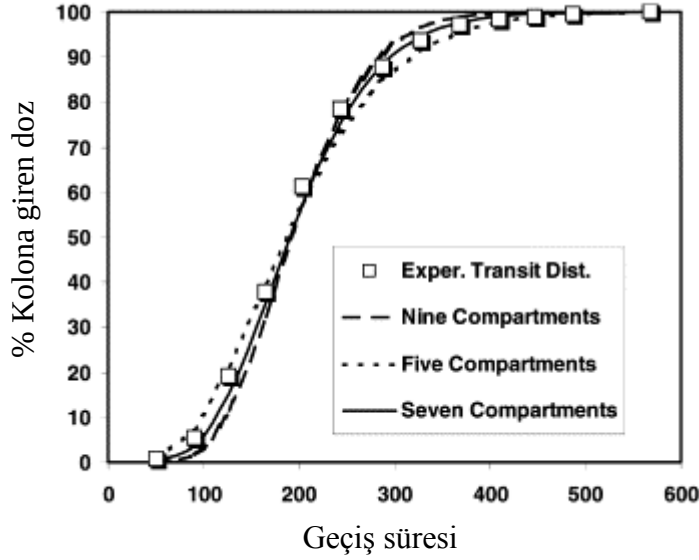
CAT modeli pasif transport taşıyan ilaçların emilimini simüle etmek üzere oluşturulmuş bir modeldir ve aşağıdaki varsayımlar üzerine kurulmuştur:

- Mide ve kalın bağırsaktaki emilim ince bağırsağa göre ihmal edilebilir düzeydedir.
- İnce bağırsaktan ilaç geçişi pasif transportla gerçekleşir.
- İlaç anlık olarak çözünür.
- İlaç, ince bağırsakta seri bağlı kompartımanlar arasında lineer transfer kinetiğiyle geçer. Bu kompartımanlar farklı hacim ve kan akış özelliklerine sahiptir; ancak ilacın kompartımanlarda kalış süreleri aynıdır.

GastroPlus™ programında kullanılan ve kısaca ACAT olarak bilinen, mekanistik emilim modelinde CAT modeline göre daha fazla fizyolojik ve fizikokimyasal özellik incelenir. Ayrıca, mide ve kalın bağırsaktaki emilim de ihmal edilmez [84]. CAT modelinden farklı olarak, çözünme hızı, çözünme hızı üzerinde pH etkisi, kontrollü salım, mide ve kalın bağırsakta emilim, ince bağırsak ve karaciğer metabolizması, ince bağırsakta degradasyon, emilim yüzey alanı, taşıyıcı ve eflüks proteinlerinin yoğunluğu ve diğer bölgesel etmenlerin ilaç emilimi üzerindeki etkileri göz önüne alınır [85].

ACAT modelinde, ilaç emilimi, mide-bağırsak kanalını seri bağlı kompartımanlara ayırarak modellenir. Mide-bağırsak kanalı 9 kompartımandan (mide, duodenum, jejunum 1, jejunum 2, ileum 1, ileum 2, ileum 3, çekum ve kolon) oluşur. İnce bağırsaktaki kompartıman sayısının optimize edilebilmesi amacıyla oluşturulan 5, 7 ve 9 kompartımanlı modeller, 400'den fazla deneysel veriyle karşılaştırılmış ve sonunda 7 kompartımanlı

modelin ince bağırsak en uygun şekilde simüle ettiğine karar verilmiştir. İnce bağırsak geçiş süreleri ve kompartımanlı modellerin karşılaştırması Şekil 2.9’da verilmektedir [85].



Şekil 2.9. İnce bağırsak geçiş süreleri [85]

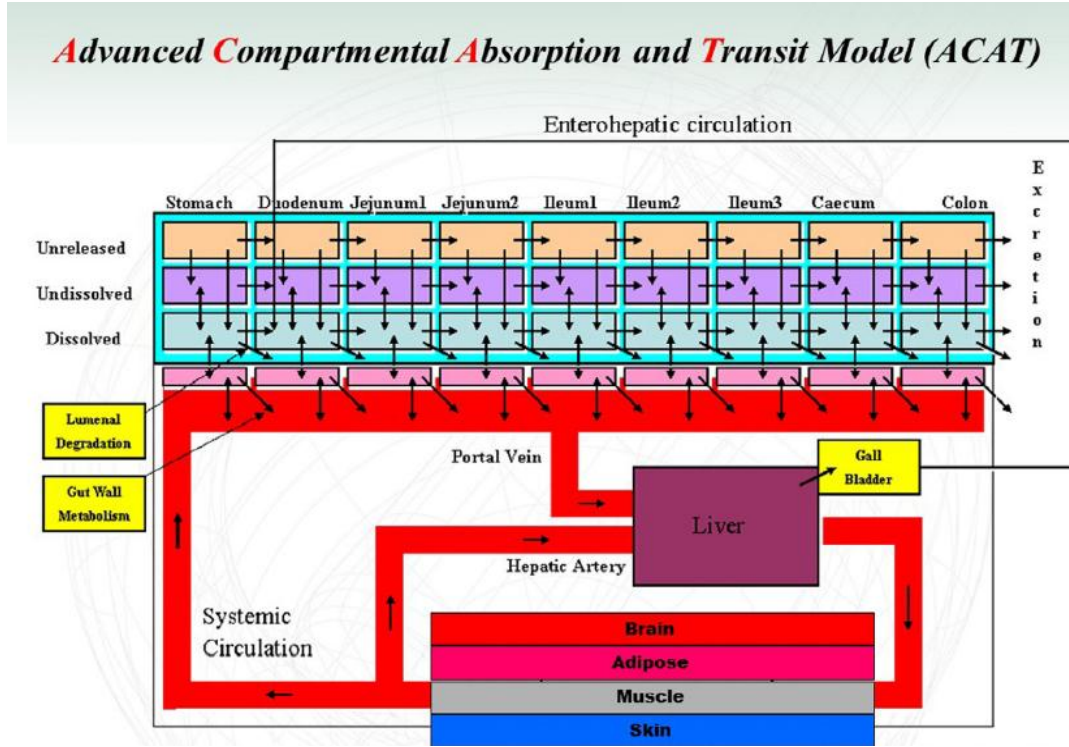
Kompartımanların pH, hacim, permeabilite gibi özellikleri daha önceden yapılmış çalışmalar temel alınarak oluşturulmuştur. Kompartımanlar arasında ilaç geçişi, birinci dereceden diferansiyel denklemlerle tanımlanmış olup, geçiş süreleri fizyolojik değerler göz önüne alınarak belirlenmiştir [86].

İnsan için, ACAT modelinin farklı kompartımanlardaki pH, geçiş süresi ve uzunluk parametreleri Çizelge 2.9’da sunulmaktadır [86].

Çizelge 2.9. ACAT modelinin parametreleri [86]

Kompartıman	pH (açlık/tokluk)	Geçiş süresi (saat)	Uzunluk (cm)
Mide	1,3 / 4,9	0,25 / 1	28
Duodenum	6,0 / 5,4	0,3	14
Jejunum (x2)	6,2-6,4 / 5,4 – 6,0	1,7	116
Ileum (x3)	6,6-7,4	1,3	174
Çekum	6,4	4,2	13
Kolon	6,8	12,6	28

ACAT modelinde, etkin maddenin, çözünürlük, permeabilite, $\log P$, pK_a , partikül büyüklüğü, doz gibi özellikleri çözünme hızı ve emilim modellerine girdi olarak girilir. Çözünme hızı, Nerst-Brunner denklemine (Eşitlik 3) göre modellenir. Emilim ise, etkin maddenin mide-bağırsak kanalının belirli bölümlerindeki permeabilitesi ve konsantrasyon farkı temel alınarak modellenir [86]. Etkin maddenin dozaj şeklinden salınmamış, çözünmemiş ve çözünmüş halleri göz önüne alınır. ACAT modelinin şematik gösterimi Resim 2.6'da sunulmaktadır [57].



Resim 2.6. ACAT modelinin şematik gösterimi [57]

Bu modelde, oral emilim, dozaj şeklinden ilaç salımı, çözünürlük, çözünme hızı, çökme hızı, kimyasal stabilite, permeabilite, taşıyıcı etkisi (inflüks-efluks), ince bağırsaktaki metabolizma faaliyetleri diferansiyel denklemlerle tanımlanmıştır. Genel olarak lineer farmakokinetik denklemler kullanılır.

GastroPlus™ programında, molekül özellikleri, fizyoloji ve farmakokinetik olmak üzere veri girişi yapılan 3 ana sekme bulunur [87].

Molekül özellikleri sekmesi

Molekül özellikleri sekmesinde, veri olarak etkin maddeye ait, molekül ağırlığı, logP, çözünürlük, biyouyumlu çözünürlük, difüzyon katsayısı, insan için P_{eff} , pK_a , enzim ve taşıyıcı özellikleri ile formülasyona ait doz, dozaj şekli, etkin madde partikül büyüklüğü gibi özellikler girilebilir. Bu özellikler, in vivo, in vitro veya in silico yöntemlerle elde edilebilir. Bazı parametreler için programdaki veriler kullanılabilir.

Çözünürlük-pH ilişkisi

İlacın emilebilmesi için öncelikle çözünmesi gerektiği için, iyonlaşma katsayısı (pK_a) ve çözünürlük faktörü (iyonize formun çözünürlüğü/non-iyonize formun çözünürlüğü), çözünürlük-pH eğrisinin tahmin edilmesinde kullanılır. Bu çözünürlük değerleri, safra tuzlarının etkisine göre düzeltilir. Her kompartımandaki safra tuzu konsantrasyonu açlık ve tokluk durumlarına göre ayarlanır ve safranın ince bağırsağın distal bölgesinden geri emilimi hesaba katılır.

pK_a tablosu sekmesi

Bu sekmede, molekül için Henderson-Hasselbach denkleminde göre pK_a değerleri belirlenir. İstenirse deneysel pH-çözünürlük profili verileri girilerek de model oluşturulur.

Moleküllerin iyonize formlarının sudaki çözünürlüğü non-iyonize formlarına göre daha fazladır. Buna göre organik asitler yüksek pH'larda, organik bazlar ise düşük pH'larda daha fazla çözünürler. GastroPlus™'ta pH'ya bağımlı çözünürlük hesaplanması bu prensibe göre yapılır.

Çözünürlük faktörü, tamamen iyonize formdaki ilacın non-iyonize formdaki ilaca oranıdır. Tek bir pH'daki çözünürlük değeri ve çözünürlük faktörü bilindiği takdirde, diğer pH'lardaki çözünürlük değerleri tahmin edilebilir. Çözünürlük faktörleri $<10 - 10^6$ aralığında değişebilmektedir.

pH - logP eğrisi

Program, ana sekmede girilen logP veya logD değerlerine göre pH-logP eğrisini hesaplar. Ayrıca bu veriler, fizyoloji sekmesinde seçilen emilim modeline göre emilim katsayılarının hesaplanmasında kullanılır.

Biyoyumlu çözünürlük

Biyoyumlu çözünürlük sekmesinde, disolüsyon modeli, nanopartikül etkisi, safra tuzlarının etkisiyle ilgili bilgiler girilir. Programda, çözünme hızı kinetiklerini tanımlamak için Nerst-Brunner denklemi, Wang-Flanagan modeli, Tekano'nun Z-Faktörü modeli ve anında çözünme modelleri arasından seçim yapılabilir.

Johnson modeli, en sık kullanılan modeldir. Bu modelde, Nerst-Brunner denkleminin silindirik ve küresel partiküller için Lu ve diğerleri [88] tarafından modifiye edilmiş hali kullanılır (Eşitlik 2.8).

$$\frac{dM_D}{dt} = \frac{D_w(1 + 2s)}{\rho h r_t s} (C_s - C_1) M_{u,t} \quad (2.8)$$

Wang-Flanagan modeli, küresel moleküllerin çözünmesini inceleyen Wang ve Flanagan tarafından ortaya atılmıştır. Eşitlik 2.9'daki denklemle ifade edilen bu model, sadece küresel moleküller için kullanılır [89].

$$\frac{dM_D}{dt} = \frac{3D_w}{\rho r_t} \left(\frac{1}{r_t} + \frac{1}{h} \right) (C_s - C_1) M_{u,t} \quad (2.9)$$

Anında çözünme (instant dissolution) modelinde çözünme hızı kinetikleri ihmal edilir ve dozaj şeklinden anında çözünme limitine kadar çözünme veya çökme varsayılır.

Takano ve diğerleri [90] tarafından oluşturulmuş Z faktörü modelinde de Nerst-Brunner denklemi temel alınmıştır. Burada $\frac{3D_w}{\rho r_t}$ terimi yerine, in vitro çözünme profilini yansıtan, formülasyona bağlı Z faktörü parametresi yer alır (Eşitlik 2.10).

$$\frac{dM_D}{dt} = z M_{u,0} \left(\frac{M_{u,t}}{M_{u,0}} \right)^{2/3} (C_s - C_1) \quad (2.10)$$

Tüm modellerde D_w difüzyon katsayısını, C_s lümendeki çözünürlüğü, C_1 lümendeki çözünmüş ilaç miktarını, ρ ilaç moleküllerinin yoğunluğunu, r_t küresel partikül yarıçapını, h difüzyon tabakası kalınlığını, s şekil faktörünü (uzunluk/çap, küresel partiküller için 1), M_d ve M_u , çözünmüş ve çözünmemiş ilaç miktarlarını gösterir.

Partikül büyüklüğü etkisi

Partikül büyüklüğü dağılımı, normal/log-normal dağılım olarak seçilebildiği gibi karmaşık partikül büyüklüğü dağılımları söz konusu olduğunda veri girişi de yapılabilir. Nanopartikül etkisini de göz önüne almak mümkündür [87].

Enzim ve taşıyıcı etkisi

Enzim ve taşıyıcıların dokulardaki dağılımları programda verilmektedir. In vitro K_m ve V_{max} değerleri kullanılarak enzim ve taşıyıcıların emilim üzerindeki etkisi gösterilebilir. Enzim ve taşıyıcıların dağılımı ACAT modeli içinde tanımlıdır [87].

Fizyoloji sekmesi

Fizyoloji sekmesinde, mide-bağırsak kanalına ait 9 kompartıman ve bu kompartımanları tanımlayan pH, yüzey alanı, geçiş süresi, hacim, uzunluk, çap, emilim faktörü, efektif permeabilite, varsa enzim ve taşıyıcı özellikleri yer alır. ACAT modelinde tanımlanmış, açlık tokluk gibi farklı fizyolojiler seçilebilir. Seçilen fizyolojinin özelliklerine göre programın yukarıda belirtilen parametrelerinde değişiklik yapılabilir.

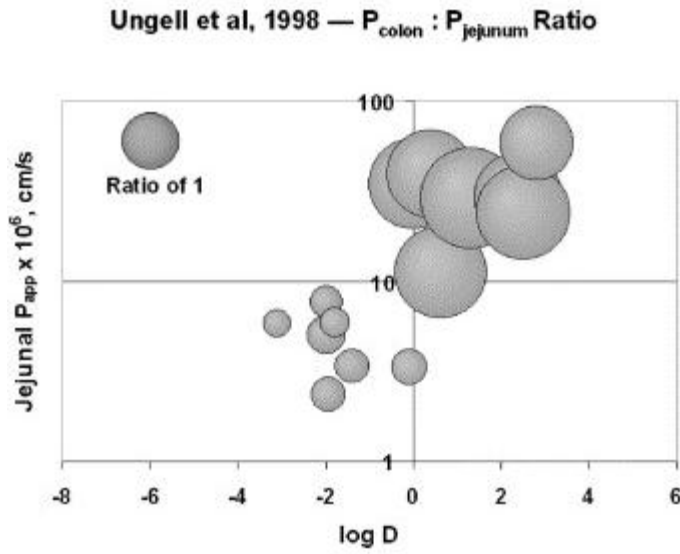
ACAT modelinde emilme hızı, ilacın efektif permeabilitesine (transselüler ve/veya paraselüler) ve her kompartımandaki emilim faktörüne bağlıdır. Emilim faktörü, mide-bağırsak kanalındaki her bölgede değişiklik gösteren yüzey alanı-hacim oranı, dağılma katsayısı, pH'ya bağımlı bölgesel permeabilite ve transselüler por miktarı ve büyüklüğü gibi parametrelerin ayarlanmasında kullanılır.

ASF (Absorption Scale Factor) modelleri

Bir ilaç molekülünün emilim katsayısı, molekülün şekline, büyüklüğüne, pK_a değerine, mide-bağırsak kanalının pH'sına bağlıdır. Pade ve Stavchansky'nin [91] yaptığı çalışmada, asidik ilaçların permeabilite katsayılarının pH 5,4'te, bazik ilaçların ise pH 7,2'de daha yüksek olduğu ve tüm ilaçlar için transselüler geçişin daha etkili olduğu gözlenmiştir. Hücreler arası sıkı bağlantı noktalarından (tight junction-TJ) ilaç geçişi ise molekül büyüklüğüyle ters orantılıdır.

Ungell ve Nylander'in [92] yaptığı çalışmada, farklı fizikokimyasal özellikteki ilaçların ince bağırsaktaki bölgesel emilim katsayıları sıçan bağırsağı kullanılarak hesaplanmıştır.

Buna göre, düşük logD ve düşük permeabiliteye sahip hidrofilik ilaçların kolon/jejunum permeabilite oranlarının 1'den küçük, buna karşın yüksek logD ve yüksek permeabiliteye sahip hidrofobik ilaçların kolon/jejunum permeabilite oranlarının 1'den büyük olduğu gözlenmiştir. Bazı pH değerlerinde, küçük hidrofilik moleküllerin yüksek parasetil geçirenlik gösterdikleri ve kolondaki transepitelyal elektriksel direncinin (TEER) ince bağırsağa göre daha yüksek olduğu bilinmektedir [93]. Transepitelyal elektriksel direnci, TJ'lar küçüldükçe artar. Kolondaki TJ'lerin ince bağırsak bölgelerine göre daha küçük olması hidrofilik ilaçlar için düşük kolon/jejunum permeabilite katsayısını açıklar.



Resim 2.7. Bölgesel permeabilite [92]

ACAT modelinde, ASF (emilim faktörleri) logD, Opt logD, Opt logD SA/V ve teorik modellere göre hesaplanır. LogD modeli, hidrofobik ve hidrofilik moleküllerin biyofarmasötik özellikleri kullanılarak oluşturulmuştur. Bu modele göre, logD'ye bağlı olarak, insan veya sıçanlardan elde edilmiş efektif permeabilite verilerine göre emilim katsayıları kalibre edilir. Bu model, pH-partisyon teorisine göre çalışır ve iyonlaşma arttıkça permeabilitenin düştüğünü varsayar. C1- C4 katsayıları, farklı kompartımanlardaki emilim faktörlerini hesaplamak için kullanılır. LogD ve Opt LogD modellerinde, ince bağırsağın sadece silindirik bir yapı olduğu varsayılır, villus ve mikrovilluslar hesaba katılmaz. Opt LogD SAV 6.1 modelinde ise villus ve mikrovillusların yüzey alanını artırıcı etkileri de göz önüne alınır [87].

Emilim katsayısı ve efektif permeabilitenin çarpılmasıyla, her kompartımandaki emilim katsayısı hesaplanmış olur.

Q_h , hepatik kan akış hızını gösterir. İnsanlar için bu değer açlık durumunda 1,5 L/dak, tokluk durumunda 2 L/dak'dır.

İnce bağırsak ve kolondaki sıvı yüzdesi, bu kompartımanlarda çözünme için kullanılabilecek sıvı miktarını gösterir.

Farmakokinetik özellikler sekmesi

Bu ekrana molekülün farmakokinetik özellikleri girilir. Kullanılacak model, kompartımanlı veya PBPK olarak seçilir.

PKPlus modülü

ACAT modeli, 1, 2 veya 3 kompartımanlı farmakokinetik modelleme yaparak plazma konsantrasyonu-zaman eğrilerinin simüle edilmesini sağlar. Plazma proteinlerine bağlanma oranı (f_p %), kan hücrelerine bağlanma (R_b), ilk geçiş etkisi (% FPE) ve renal klirens (CL_r) gibi farmakokinetik parametreler bu modelde hesaba katılır. Ana kompartımandan ilaç eliminasyonu lineer veya non-lineer kinetikle gerçekleşebilir. PKPlus modülünde hesaplanan değerler farmakokinetik sekmesinde kullanılır [87].

PBPK modülü

PBPK modülü, doku büyüklükleri, perfüzyon hızları ve serbest haldeki ilacın fiziksel olarak uygun kompartımanlara dağılmasını göz önüne alan mekanistik bir yaklaşımdır. PBPK modellerinde, in vitro ölçümler ve in siliko tahminler kullanılarak plazma ve dokulardaki ilaç konsantrasyonları tahmin edilebilir. Farklı türler için elde edilmiş veriler, çeşitli yöntemler kullanılarak insana uyarlanabilir.

Simülasyon sekmesi

Bu sekmede, girilen verilere göre simülasyon yapılır.

% F_a : Net emilim değeridir. İnce bağırsak lümeninden enterosite geçen dozu gösterir.

$\%FD_p$: Portal damara ulaşan doz yüzdesini gösterir. İnce bağırsak metabolizması ve ince bağırsakta akümülayon olmadığı taktirde bu değır $\%F_a$ ’ya eşittir.

$\%F$: Biyoyararlanım yüzdesi ince bağırsak metabolizması, ince bağırsakta akümülayon veya karaciğer metabolizması olmadığı taktirde, $\%F_a$, $\%FD_p$ ve $\%F$ birbirine eşittir.

C_{max} : Doruk plazma konsantrasyonu

t_{max} : Doruk konsantrasyonuna ulaşma süresi

$AUC_{(0-inf)}$: Eğri altında kalan alan (sonsuza ekstrapolasyon yapılmış)

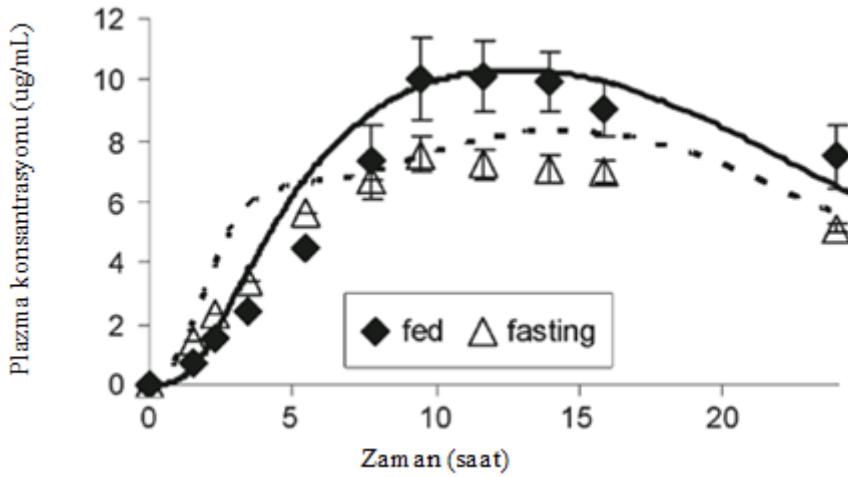
$AUC_{(0-t)}$: Eğri altında kalan alan (simülasyon süresince)

Grafik sekmesi

Bu ekranda plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi elde edilir. Gerçek eğri ve tahmin edilen eğrinin uygunluğu görülebilir.

GastroPlus™’ın kullanıldığı çalışmalar

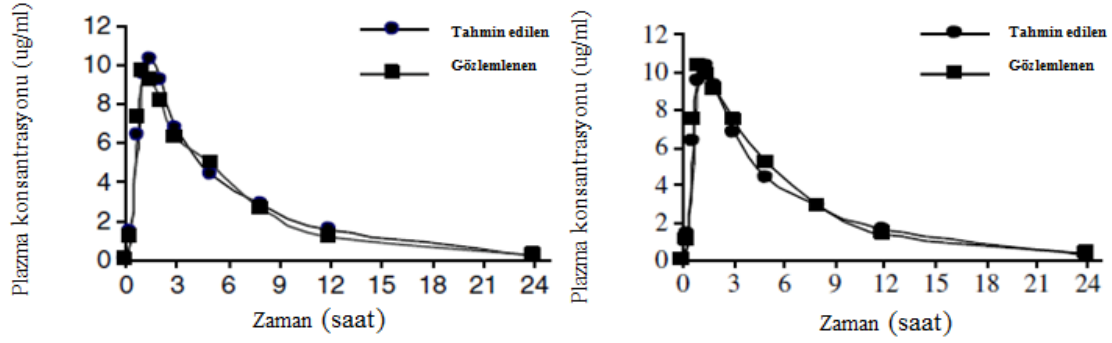
Parrott ve diğerlerinin [86] 2008 yılında gerçekleştirdiği çalışmada, zayıf baz özelliğinde, yüksek çözünürlük ve permeabilite gösteren teofilin molekülünün emilimi üzerinde yiyecek etkisi incelenmiş ve GastroPlus™ programıyla hemen salım yapan ve uzun salım yapan dozaj şekillerinin emilimi simüle edilmiştir. Resim 2.8’te gösterildiği gibi, GastroPlus™ programındaki açlık ve tokluk durumlarına ait tanımlanmış fizyolojik özellikler kullanılarak yapılmış simülasyonlar, gönüllülerden elde edilmiş plazma konsantrasyon eğrileriyle uyumludur (Resim 2.8).



Resim 2.8. Teofilin uzun salımlı tabletlerin açlık ve tokluk durumlarının GastroPlus™'la simülasyonu [86]

Saibi ve diğerlerinin [94] hemen salım yapan risperidone tabletler üzerinde yaptığı IVIVC çalışmasındaki amaç, risperidonun fizikokimyasal ve farmakokinetik özelliklerinin, ayrıca plazma konsantrasyon verilerinin kullanılarak in vivo emilim profilinin tahmin edilmesi ve sonrasında IVIVC geliştirilmesidir. Bu çalışmada izlenen yöntem, fizikokimyasal ve farmakokinetik verilerin toplanması ve GastroPlus™ programına girilmesi, emilim modelinin oluşturulması ve ilaç için IVIVC kurulması şeklindedir.

Yapılan emilim simülasyonlarında uygun bir emilim modeli elde edilmiş ve uygunluk kriterlerine göre değerlendirilmiştir. Buna göre, C_{max} ve AUC'deki tahmin hatası değeri hem test hem de referans ürün için %10'dan küçük olarak hesaplanabilmesiyle modelin uygunluğu teyit edilmiştir. Referans ve test ürünleri için oluşturulan modeller Şekil 2.10'te sunulmaktadır.



Şekil 2.10. Risperidon referans ve test ürünleri için oluşturulmuş modelleri [94]

İkinci adım olarak dekonvolüsyon ve konvolüsyon yöntemleri kullanılarak IVIVC geliştirilmiştir.

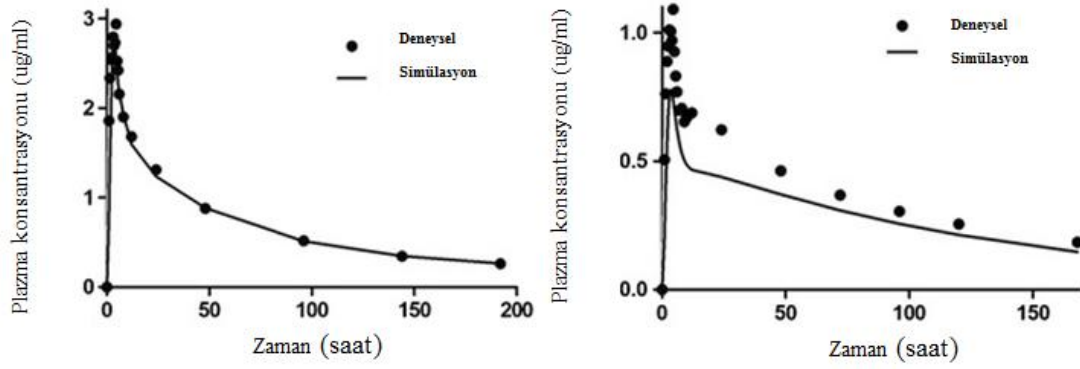
Dekonvolüsyon yönteminde, farklı pH'lardan elde edilmiş olan in vitro çözünme hızı verileri GastroPlus™ yardımıyla hesaplanmış in vivo salım verileriyle karşılaştırılmıştır. Yapılan regresyon analizinde tüm ortamlar için r^2 değerinin 1'e yakın olduğu görülmüştür.

Konvolüsyon yönteminde ise, gerçek in vivo plazma-konsantrasyon verileri ve GastroPlus™ yardımıyla tahmin edilen plazma-konsantrasyon eğrileri IVIVC açısından karşılaştırılmıştır.

Sonuçta, hem test hem referans ürün için tüm çözünme ortamlarında A düzey IVIVC kurulabilmiştir.

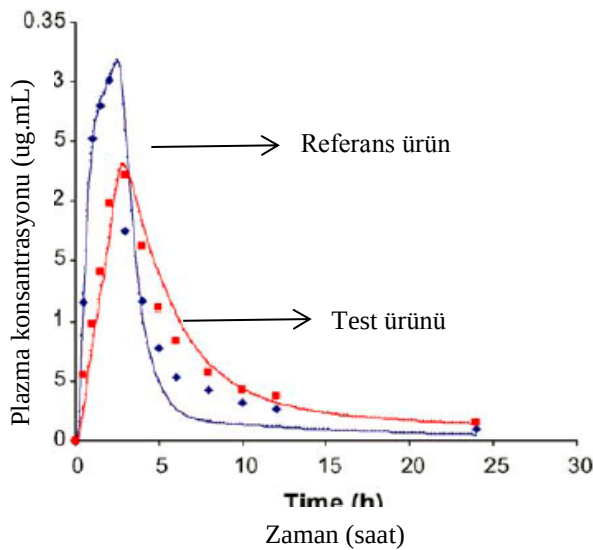
Honorio ve diğerlerinin [95] efavirenz tabletlerle gerçekleştirdiği IVIVC çalışmasında, GastroPlus™ programı kullanılarak A düzey in vitro in vivo korelasyon geliştirilmiştir. Korelasyon oluşturulmasında kullanılan in vitro çözünme hızı verileri toz ve tabletlerden elde edilmiştir. Efavirenzin fizikokimyasal özellikleri kullanılarak oluşturulan modelle elde edilen plazma konsantrasyon eğrisinin in vivo plazma konsantrasyon eğrisiyle oldukça benzer olduğu görülmüştür (Şekil 2.11). Wagner-Nelson ve Loo-Riegelman modelleri kullanılarak A düzey in vitro in vivo korelasyon oluşturulmuştur. Emilen ilaç yüzdesi miktarına göre, %0,5 SLS içeren çözünme hızı ortamı, efavirenz tabletler için biyoyoumlu sonuç veren bir ortamdır. Bu çalışmada elde edilen veriler, GastroPlus™ kullanılarak

yapılan in siliko çalışmaların BCS Sınıf 2 ilaç geliştirmesinde önemli veriler sağladığını ortaya koymuştur.



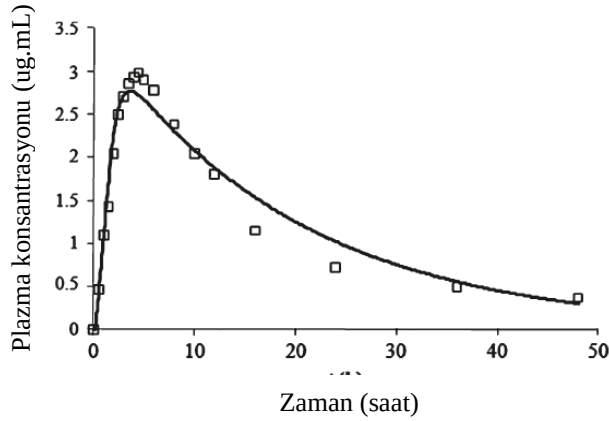
Şekil 2.11. Farklı formülasyonlara sahip efavirenz tabletlerin deneysel ve simülasyonla elde edilmiş plazma-konsantrasyon eğrileri [95]

Wei ve Löbenberg [27] tarafından gliburid etkin maddesi üzerinde gerçekleştirilen çalışmada, dinamik disolüsyon yöntemiyle elde edilen çözünme hızı verileri ve pH-çözünürlük verileri kullanılarak GastroPlus™ programında simülasyon yapılmıştır. İki farklı formülasyon için gerçekleştirilen çalışmada r^2 değerleri referans ve test ürünleri için 0,94 ve 0,93 olarak hesaplanmıştır. Şekil 2.12’de referans ve test ürünleri için deneysel ve tahmin edilen plazma konsantrasyon eğrileri verilmektedir.



Şekil 2.12. Referans ve test ürünleri için deneysel ve simülasyonla elde edilen plazma konsantrasyonları (deneysel veriler noktayla, simülasyon sonuçları düz çizgiyle gösterilmektedir) [27]

Grbic ve diğerlerinin [96] hemen salım yapan gliklazid tabletler üzerinde gerçekleştirdiği çalışmada, GastroPlus™ programı kullanılarak ilaca özgü bir emilim modeli oluşturulmuştur. Daha sonra bu emilim modeli kullanılarak IVIVC için hedef in vivo çözünme hızı profili belirlenmiştir. Gliklazid 80 mg IR tabletlerin fizikokimyasal ve farmakokinetik özellikleri kullanılarak oluşturan emilim modelinde C_{max} ve AUC için elde edilen tahmin hataları, %7,05 ve %6,13'tür. Şekil 2.13'te deneysel ve tahmin edilen eğrilerin karşılaştırması verilmektedir. Bu model temel alınarak farklı salım özelliklerine ait in vitro çözünme hızı verileriyle plazma konsantrasyon eğrisi simülasyonları yapılmış ve düzey A IVIVC kurulmuştur.



Şekil 2.13. Gliklazid tabletler için deneysel ve simülasyonla elde edilen plazma konsantrasyonları (Deneysel veriler noktayla, simülasyon sonuçları düz çizgiyle gösterilmektedir) [96]

2.6.5. ADMET Predictor™

ADMET Predictor™, daha önceleri QMPRPLus™ adı ile bilinen, ilaç ve benzeri bileşiklerin moleküler yapılarından yola çıkarak bilgisayar simülasyonları aracılığı ile bu moleküllerin emilim, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisite (ADMET) özelliklerine ait tahminler üreten gelişmiş bir yazılımdır. Bu yazılım, molekül geliştirme aşamasında, moleküllere ait ADMET özelliklerinin belirlenmesi konusunda yardımcı olur. Molekülün yapısına göre, pK_a , $\log P/\log D$, biyoyoumlu çözünürlük, kan/plazma konsantrasyon oranı gibi parametreleri tahmin etmede kullanılır. Yazılımın molekül özelliklerini tahmin edebilmesi için öncelikle molekül yapısını tanıması gerekmektedir. Bu amaçla hazırlanmış 2D ve 3D molekül yapılarını içeren ASCII tekst dosyaları yazılıma girdi olarak sunulur.

Yazılım, bu dosyaları okuyarak moleküler tanımlayıcıların değerlerini belirler. Daha sonra bu değerleri bağımsız matematiksel modellere girdi olarak yönlendirir. Bu modeller genelde nonlinear yapıdadır ve yapay zeka algoritmaları içerirler. Matematiksel modellerin çözülmesi sonucu yukarıda belirlenmiş ADMET özelliklerine ait tahminler çıktılar halinde elde edilmiş olur.

Programın uygulanabilirliğine yönelik olarak Gastroplus™'la yapılan modelleme çalışması

GastroPlus™ programının kullanılmasına yönelik yapılan çalışmalarda, Zentiva Sağlık Ürünleri'ne ait uzun salımlı tablet formülasyonuna sahip, BCS Sınıf 1 bir molekülün (ZTV01) modellenmesi üzerinde çalışılmıştır. Ürün, şu an ruhsatlandırma aşamasında olduğu için molekül ismi verilememektedir. Bu molekül uzun salım yapan tablet şeklindedir. İlk olarak, literatürden elde edilen 0,6 mg dozundaki infüzyona ait intravenöz data ile model oluşturulmuştur. Daha sonra bu modelden elde edilen farmakokinetik parametreler kullanılarak uzun salım yapan tabletlerin plazma konsantrasyonu-zaman eğrisinin tahmin edilmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır.

Gerçekleştirilen modelleme aşamaları ve elde edilen simülasyon ekranları, bölümün ilerleyen kısımlarında anlatılmaktadır.

*Molekül özellikleri sekmesi**Moleküle ait veriler*

ZTV01 etkin maddesinin molekül formülü $C_{28}H_{30}N_2O_2.HBr$ 'dir. Molekül özellikleri Çizelge 2.10'da sunulmaktadır.

Çizelge 2.10. Molekül özellikleri

Parametre	Değer
Molekül ağırlığı*	462.55 g/mol
Log D (pH 7,4)*	2.7
P_{eff} (insan için)*	$4.679 \text{ cm/s} \times 10^4$
Doz*	0.6 mg
Çözünürlük (pH 1,2)*	0.01
Ortalama çöküş zamanı**	900 sn
Difüzyon katsayısı***	$0.6089 \text{ cm}^2/\text{s} \times 10^5$
Partikül yoğunluğu**	25 g/mL
Partikül boyutu**	$R=10 \text{ }\mu\text{m}$

*Literatür verisi

**GastroPlus™'ta varsayılan değerler

***Program tarafından hesaplanan değer

ZTV01 molekülüne ait Çizelge 2.10'da belirtilen özellikler, GastroPlus™'ta molekül özellikleri ekranına Resim 2.9'da gösterildiği gibi girilmiştir.

GastroPlus(TM): Darifenacin.mdb (C:\Dar...\Dar...)

File Edit Database Simulation Setup Controlled Release Tools Modules (Optional) Help

Compound Gut Physiology-Hum Pharmacokinetics Simulation Graph

Selected Compound

Current= 2; Total = 7

Molecular Formula:

Molecular Weight (g/mol):

Reference logD: @pH:

pKa Table

Enzyme Table

Transporter Table

SI Trans Time (h) = 3.209 Mean Abs Time (h) = 0.343
 Longest Diss. Time (h) is @ pH 1.0 = 0.542 hours
 Max Abs Dose (5+) = 7.937E+4 mg. Max Abs Dose (lit) = 1.54E+4 mg.

Support Files
 IV 0.6 mg.ipd IV 0.6 mg.opd
 IV 0.6 mg.spd

Dosage Form: Initial Dose (mg):
 Infusion Time, h:
 pH for Reference Solubility:
 Solubility (mg/mL @pH=12):
 Mean Precipitation Time (sec):
 Diff. Coeff. (cm²/s x 10⁻⁵):
 Drug Particle Density (g/mL):
 Particle Size: R=25.00, D=50.00

Effective Permeability
 Source:
 P_{eff} (cm/s x 10⁻⁴):
 Sim P_{eff} x10⁻⁴ (Human):
 Convert from User Data

Biorelevant Solubilities

Dose No. = 5.852E-4

Absorption No. = 9.369

Dissolution No. = 5.918

Notes
 On 9/1/2014 some pKa values were fitted to experimental Solubility-pH profile and updated as:
 Acid pKa from 9.200 to 25.00 and its Solubility Factor from 50.00 to 50.00
 On 9/1/2014 some pKa values were fitted to experimental Solubility-pH profile and updated as:
 Base pKa from 9.200 to 9.443 and its Solubility Factor from 50.00 to 439.4

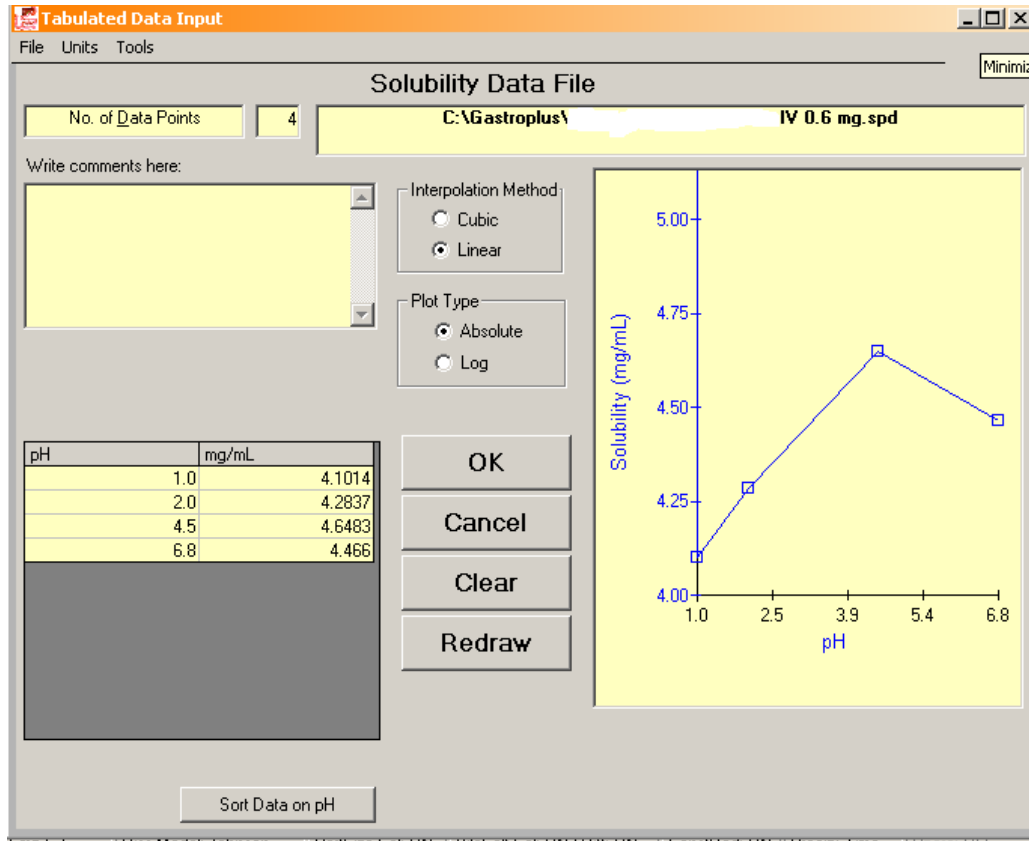
pKa Table | logD: Emp-6.1 | Diss Model: Johnson | PartSize-Sol: ON | BileSalt-Sol: ON | Diff: ON | ConstRad: ON | Precip: Time | Ppara: OFF | EHC: OFF

Resim 2.9. ZTV01 molekülü için molekül özellikleri sekmesi

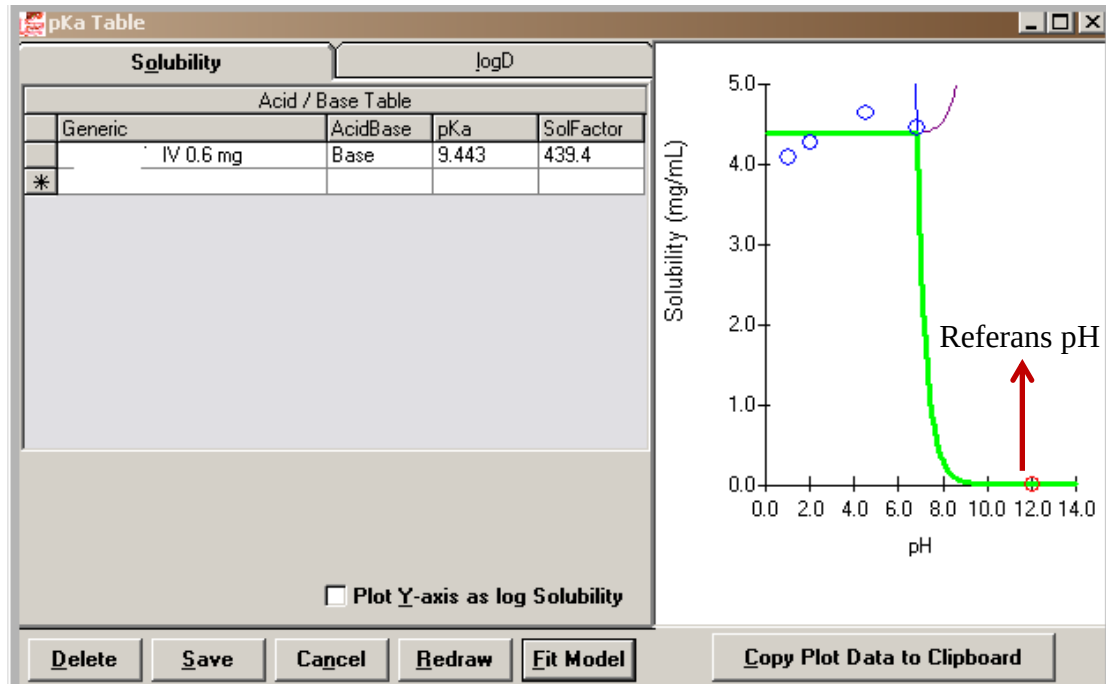
Molekül özellikleri sekmesinin içinde pK_a tablosu, enzim tablosu, taşıyıcı tablosu, biyoyumlu çözünürlük özellikleri gibi alt sekmeler bulunmaktadır.

pK_a Tablosu ve pH - çözünürlük profili verilerinin girişi

ZTV01 etkin maddesi için shake-flask metoduyla yapılmış olan çözünürlük çalışması sonuçları pH-çözünürlük profili olarak GastroPlus™'a yüklenmiştir (Resim 2.10). Program bu verileri kullanarak Henderson-Hasselbach denklemine göre pH-çözünürlük modeli oluşturmuş ve pK_a hesaplaması yapmıştır. Çözünürlük modeli Resim 2.11'de gösterilmektedir.



Resim 2.10. ZTV01 molekülünün pH-çözünürlük profili

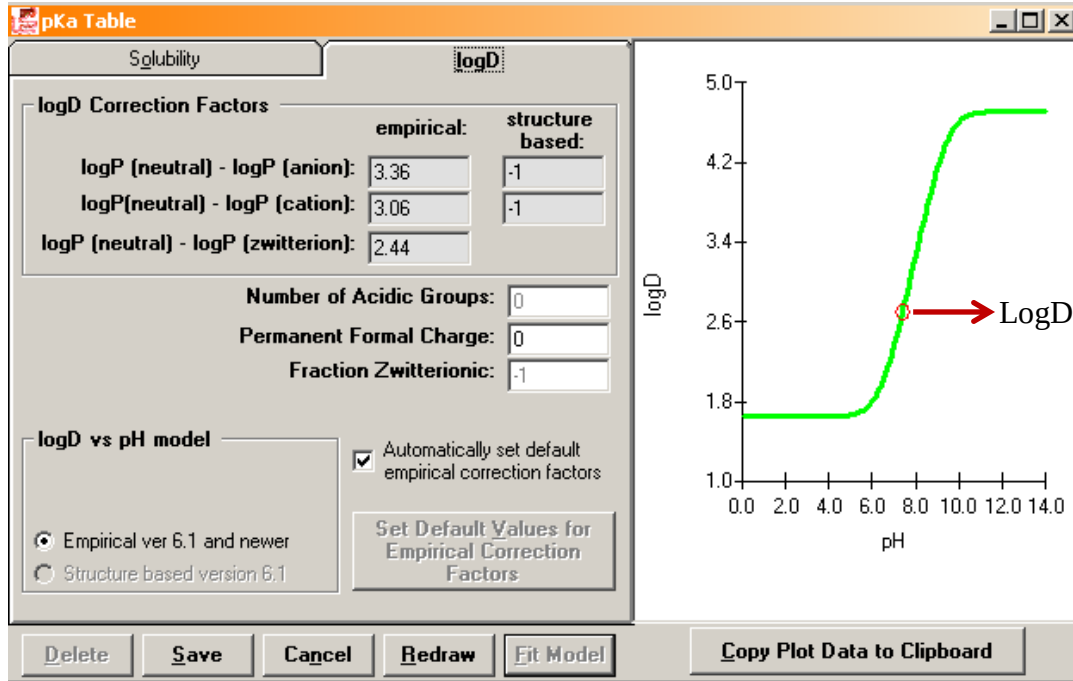


Resim 2.11. ZTV01 molekülünün Henderson-Hasselbach denkleminde göre oluşturulmuş pH-çözünürlük modeli

Çözünürlük faktörü, tamamen iyonize formdaki ilacın non-iyonize formdaki ilaca oranıdır. Tek bir pH'daki çözünürlük değeri ve çözünürlük faktörü bilindiği takdirde, diğer pH'lardaki çözünürlük değerleri tahmin edilebilir. Çözünürlük faktörleri $< 10^{-10}$ - 10^6 aralığında değişebilmektedir.

pH - logP eğrisi

Program, ana sekmede girilen logP veya logD değerlerine göre pH-logP eğrisini hesaplar. Ayrıca bu veriler, fizyoloji sekmesinde seçilen emilim modeline göre emilim katsayılarının hesaplanmasında kullanılır. pH – logP eğrisi Resim 2.12’de sunulmaktadır.



Resim 2.12. ZTV01 molekülünün pH-logD eğrisi

Biyoyumlu çözünürlük sekmesi

Bu sekmede, çözünme hızı modeli, nanopartikül etkisi, safra tuzlarının etkisiyle ilgili bilgiler girilmiştir. Biyoyumlu veriler mevcut olmadığı için, safra tuzu etkisi programda teorik olarak hesaplanmıştır. Çözünme hızı modeli olarak Johnson modeli seçilmiştir. Biyoyumlu çözünürlük sekmesi ve seçilen değerler Resim 2.13’te sunulmaktadır.

Dissolution Model for: Darifenacin IV 0.6 mg

Dissolution Model: **Johnson** Z-factor (mL/mg/s): 0 **Fit to In Vitro Data**

Effect of Temperature on Solubility
 Ref Temp [degC]: 37 Melting Point [degC]: 0

Nanoparticle Effect
☒ **Adjust solubility for nanoparticle effect** **Nano Factor Effect for 25.00 um particles is 1.000**
 Nano Factor: 0.5 Intertension (J/m²): 0.05

Bile Salt Effect
☒ **Adjust solubility for bile salt effect**
☒ **Adjust diff coeff for bile salt effect**
 Solubilization Ratio (SR): -1 **Fit to In Vitro Data**
☒ **Use theoretical solubilization ratio**
Theoretical Solubilization Ratio = 1.26E+5 will be used
Duodenal solubility at bile salt concentration 14.44mM will be 148.2 mg/mL

Biorelevant In Vitro Solubilities
 At least one of the FaSSiF or FeSSiF solubilities must be specified to calculate solubilization ratio
 Enter 0 for values of biorelevant solubilities that are not available. Zero values are not used in SR calculation

	SGF	FaSSiF	FeSSiF
pH:	1.2	6.5	5
Bile Salt Conc (mM):	0	3	15
Solubility (mg/mL):	0	0	0

Diffusion Layer Thickness
☒ **Adjust with changing radius up to maximum**
☐ **Use constant value** Maximum Diff Layer Thick [um] 30

Resim 2.13. ZTV01 molekülü için biyoyoumlu çözünürlük sekmesi

Fizyolojik özellikler sekmesi

Fizyoloji ekranında, varsa enzim ve taşıyıcı özellikleri yer alır. Bu molekül uzun salımlı bir molekül olduğu için, insan tokluk durumu fizyolojisi seçilmiştir. Emilim modeli olarak, ince bağırsağın yüzey alanını artırıcı etkisini hesaba katan Opt LogD Model SAV 6.1 kullanılmıştır.

Programdaki mide-bağırsak kanalına ait 9 kompartımanı tanımlayan pH, geçiş süresi, hacim, uzunluk, çap, emilim faktörü, efektif permeabilite gibi fizyolojik özellikler ve emilim faktörleri değerlerinde değişiklik yapılmamış, programda varsayılan değerler kullanılmıştır. Fizyolojik özellikler sekmesine girilen özellikleri Resim 2.14'te sunulmaktadır.

GastroPlus (TM): Darifenacin.mdb (C:\Dar...\Dar...)

File Edit Database Simulation Setup Controlled Release Tools Modules (Optional) Help

Compound Gut Physiology-Hum Pharmacokinetics Simulation Graph

Compartmental Parameters

IV 0.6 mg Reset All Values Excrete all un-absorbed drug at the end of gut transit time Zero-order gastric emptying

Compartment	Peff	ASF	pH	Transit Time (h)	Volume (mL)	Length (cm)	Radius (cm)	SEF
Stomach	0	0.0	4.90	1.00	931.2	28.29	9.67	1.000
Duodenum	0	2.755	5.40	0.26	41.56	14.13	1.53	4.235
Jejunum 1	0	2.712	5.40	0.93	154.2	58.40	1.45	3.949
Jejunum 2	0	2.703	6.00	0.74	122.3	58.40	1.29	3.489
Ileum 1	0	2.706	6.60	0.58	94.29	58.40	1.13	3.029
Ileum 2	0	2.678	6.90	0.42	70.53	58.40	0.98	2.569
Ileum 3	0	2.666	7.40	0.29	49.83	58.40	0.82	2.109
Caecum	0	1.050	6.40	4.19	47.49	13.19	3.39	1.790
Asc Colon	0	2.668	6.80	12.57	50.33	27.65	2.41	2.480

C1-C4: 0.06944 0.43028 0.12147 0.46632

Physiology: Human - Physiological - Fed

ASF Model: Opt logD Model SA/V 6.1

Qh (L/min): 2

Percent Fluid in SI: 40 Colon: 10

Notes

On 9/1/2014 some pKa values were fitted to experimental Solubility-pH profile and updated as:
 Acid pKa from 9.200 to 25.00 and its Solubility Factor from 50.00 to 50.00
 On 9/1/2014 some pKa values were fitted to experimental Solubility-pH profile and updated as:
 Base pKa from 9.200 to 9.443 and its Solubility Factor from 50.00 to 439.4

pKa Table I logD: Emp-6.1 Diss Model: Johnson PartSize-Sol: ON BileSalt-Sol: ON IDiff: ON ConstRad: ON Precip: Time Ppara: OFF EHC: OFF

Resim 2.14. ZTV01 molekülü için fizyolojik özellikler ekranı

Farmakokinetik özellikler sekmesi

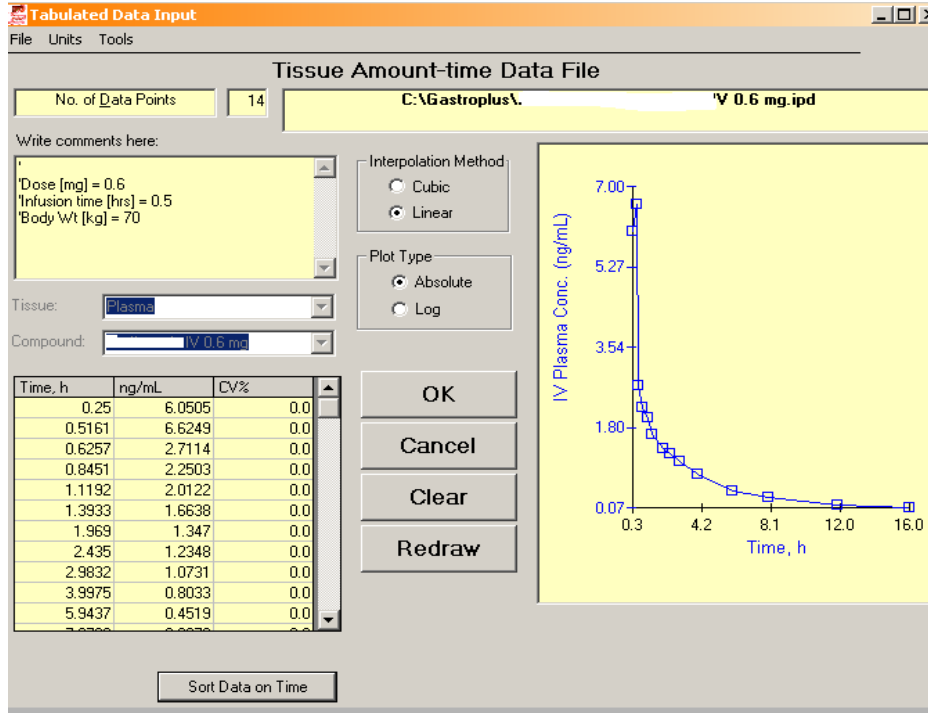
Bu ekrana molekülün farmakokinetik özellikleri girilir. Bu molekül için, kompartımanlı model kullanılmış, intravenöz datalar GastroPlus™'ın PK modülüne girilerek farmakokinetik parametreler hesaplanmış ve sonra bu ekrana aktarılmıştır.

Plazma proteinlerine bağlanma yüzdesi, kan/plazma konsantrasyon oranı gibi değerler literatürden alınmıştır.

Renal klirens değeri, dağılma hacimleri ve kompartımanlar arası hız sabitleri gibi değerler PKPlus modülünde hesaplanmıştır.

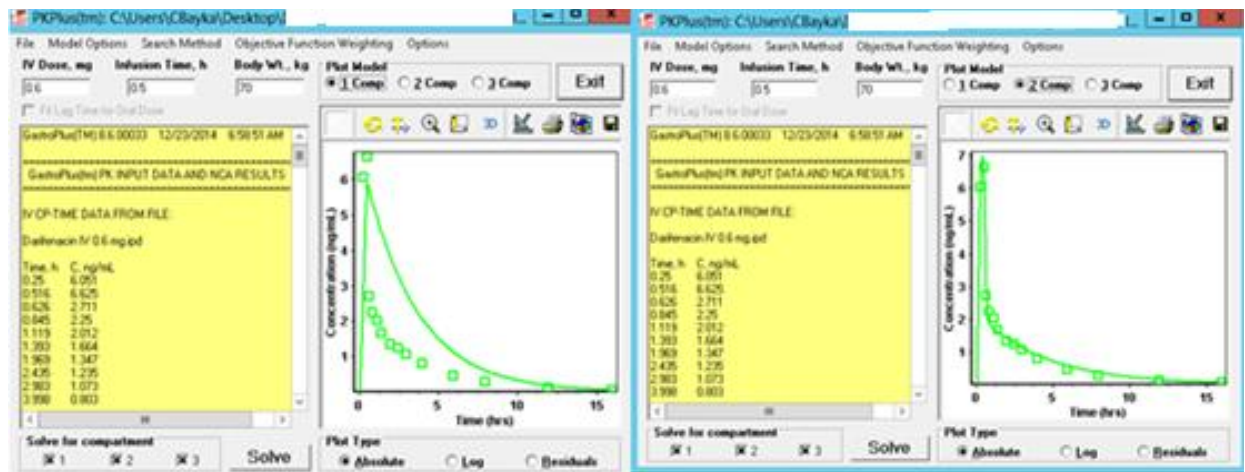
PKPlus modülü

PKPlus modülüne 0,6 mg'lık infüzyon için literatürden alınmış IV veriler girilmiş ve programda bu veriler kullanılarak 1, 2 veya 3 kompartımanlı farmakokinetik model için çözülmüştür. Resim 2.15'te IV plazma konsantrasyonu-zaman verileri sunulmaktadır.



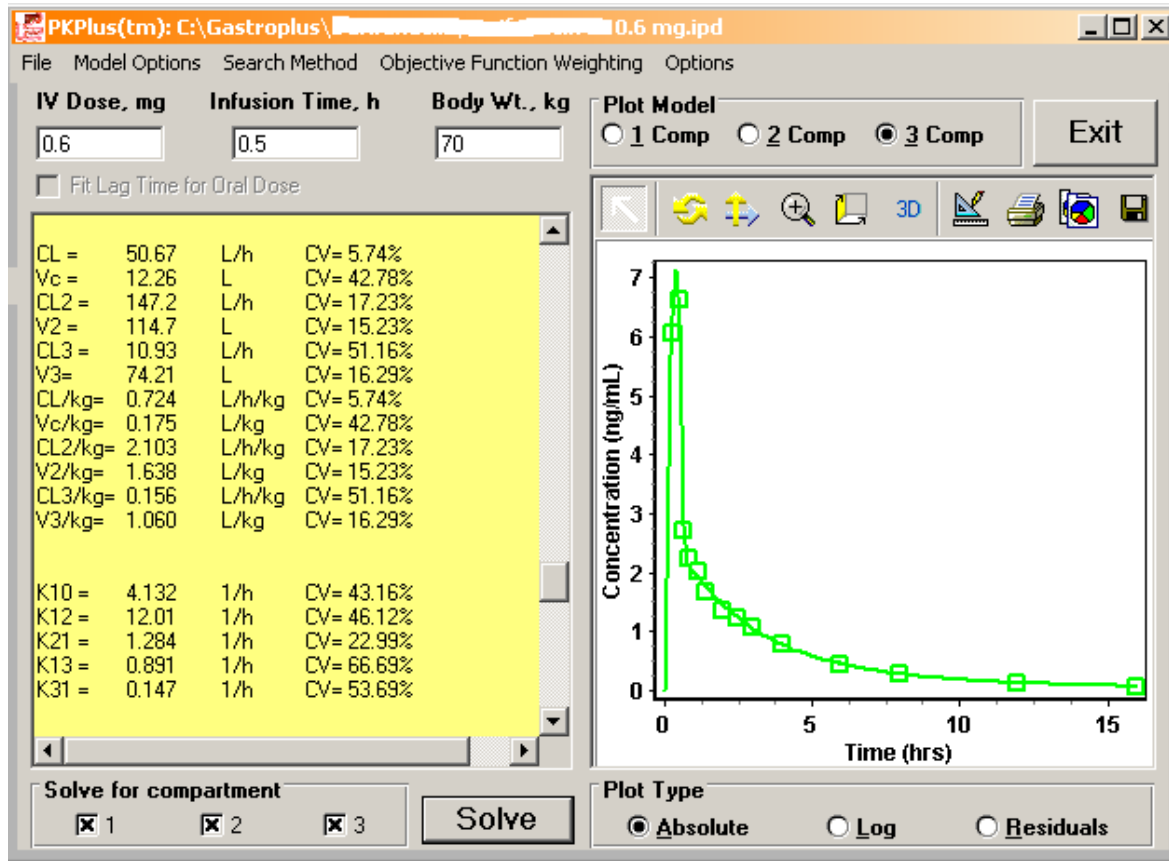
Resim 2.15. ZTV01 molekülüne ait literatürden elde edilmiş IV veri

Resim 2.16 ve Resim 2.17’de görülebileceği gibi, in vivo verilerle en uyumlu sonuç 3 kompartımanlı modelle elde edilebilmiştir. Resim 2.16’da, IV verilerin 1 ve 2 kompartımanlı modele uyarlanmış halleri gösterilmektedir.



Resim 2.16. IV verinin 1 ve 2 kompartımanlı modele uyarlanmasıyla elde edilen grafikler

Resim 2.17’de IV verinin 3 kompartımanlı modele uyarlanmış hali sunulmaktadır:



Resim 2.17. ZTV01 molekülünün farmakokinetik parametrelerinin 3 kompartımanlı modele göre elde edilmesi

3 kompartımanlı modele göre hesaplanmış renal klirens (CL_r), dağılma hacmi ve kompartımanlar arası hız sabitleri farmakokinetik sekmesine aktarılmıştır. IV verilere göre hesaplanan bu değerler ve literatürden alınan plazma proteinlerine bağlanma yüzdesi ($\%F_{up}$) de kullanılarak simülasyon gerçekleştirilmiştir.

GastroPlus(TM): Darifenacin.mdb (C:\Dar...\Dar...)

File Edit Database Simulation Setup Controlled Release Tools Modules (Optional) Help

Compound Gut Physiology-Hum **Pharmacokinetics** Simulation Graph

PK Parameters

New PBPK PK Model: Compartmental

Body Weight (kg): 70

FPE (if fixed) [%]

Oral: 0 Intestinal: 0 Liver: 73

Blood/plasma Conc Ratio: 0.68

☐ Use Exp Plasma Fup [%]: 2

☒ Use Adj Plasma Fup [%]: 1.885

Renal Clearance CLr (L/h/kg): 0

CL (L/h): 50.668 or (L/h/kg): 0.72383

Vc (L/kg): 0.17518

T 1/2 (h): 6.17

K12 (1/h): 12.008 K13 (1/h): 0.89118

K21 (1/h): 1.284 K31 (1/h): 0.14726

V2 (L/kg): 1.6383 V3 (L/kg): 1.0601

Observed Values

Fa %: 0 CMax (µg/mL): 0

FDp %: 0 Tmax (h): 0

F %: 0 AUC (ng-h/mL): 0

Hepatic Clearance (L/h): 0

IV 0.6 mg

Metabolism/Transporter Scale Factors

Enzymes

	Gut	Liver
Vmax SF:	1	1
Km SF:	1	1

Gut Transporters

	Apical	Basolateral
Influx Vmax SF:	1	1
Influx Km SF:	1	1
Efflux Vmax SF:	1	1
Efflux Km SF:	1	1

Transfer SFs to Enz/Trans tables Liver Enzyme Turnover Rates

Notes

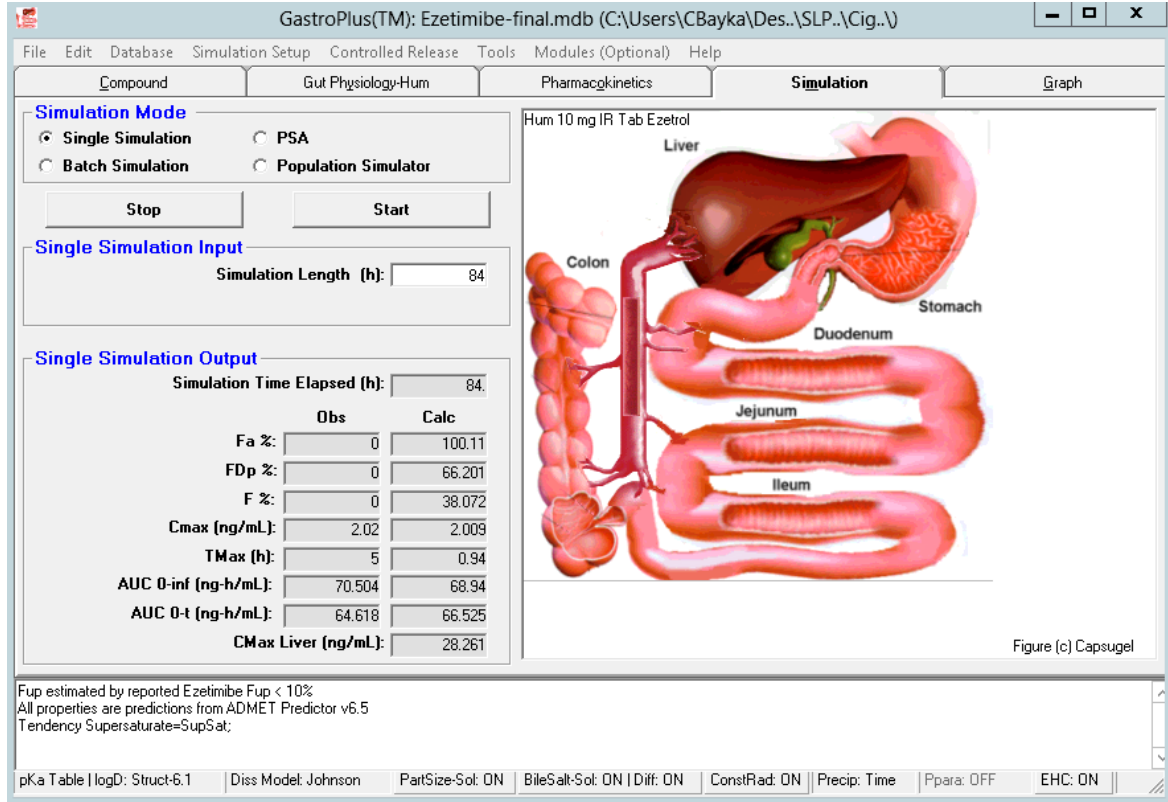
On 9/1/2014 some pKa values were fitted to experimental Solubility-pH profile and updated as:
Acid pKa from 9.200 to 25.00 and its Solubility Factor from 50.00 to 50.00
On 9/1/2014 some pKa values were fitted to experimental Solubility-pH profile and updated as:
Base pKa from 9.200 to 9.443 and its Solubility Factor from 50.00 to 439.4

pKa Table | logD: Emp-6.1 Diss Model: Johnson PartSize-Sol: ON BileSalt-Sol: ON Diff: ON ConstRad: ON Precip: Time Ppara: OFF EHC: OFF

Resim 2.18. ZTV01 molekülü için PKPlus modülünden farmakokinetik sekmesine aktarılmış farmakokinetik parametreler

Simülasyon sekmesi

Farmakokinetik sekmesinde girilen değerlere göre 0,6 mg'lık infüzyonun plazma konsantrasyon eğrisini tahmin edebilmek için simülasyon yapılmıştır (Resim 2.19). Çizelge 2.11'de, deneysel değerlerle hesaplanan değerler arasındaki karşılaştırma ve tahmin hataları sunulmaktadır.



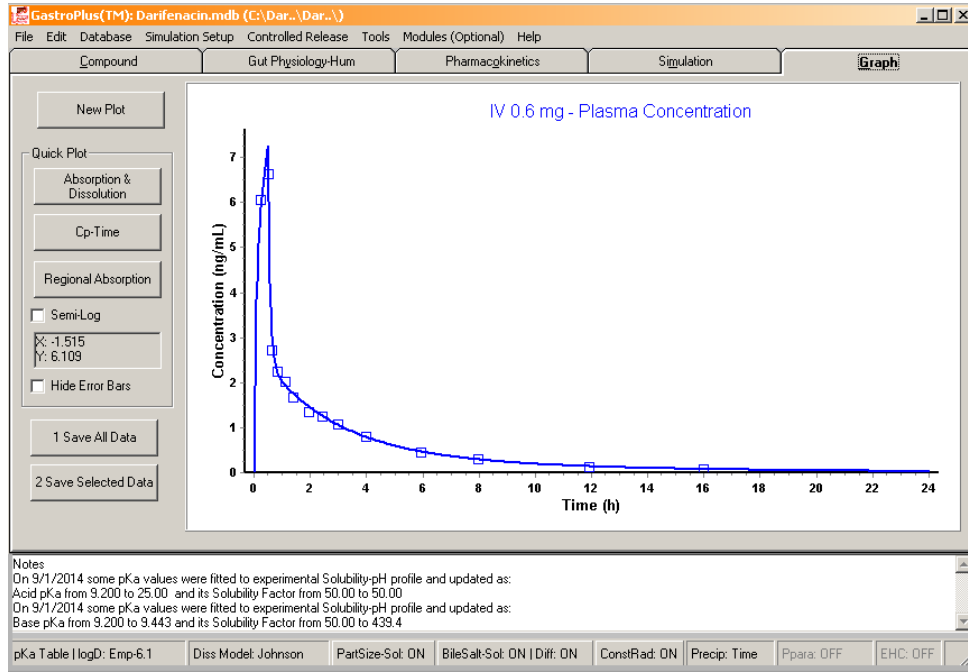
Resim 2.19. Simülasyon ekranı

Çizelge 2.11. 0.6 mg'lık infüzyon için farmakokinetik parametrelerin karşılaştırılması

Farmakokinetik parametre	Gözlemlenen değer	Kestirilen değer	Kestirim hatası (%)
AUC	11,409	11,837	3,75
C _{max}	6,62	7,26	9,6

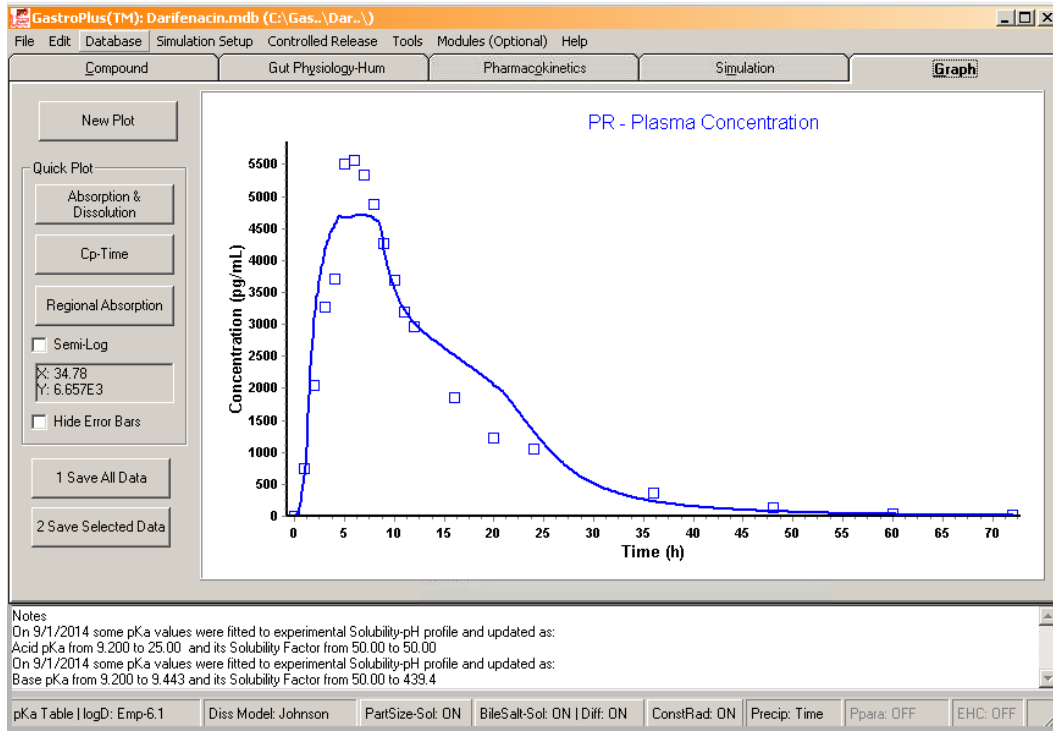
Grafik sekmesi

Bu ekranda simülasyon ekranında gerçekleştirilen simülasyon sonucu elde edilen plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi görülmektedir. Resim 2.20’de deneysel veriler ve tahmin edilen eğrinin uygunluğu görülebilir. AUC, C_{max} ve t_{max} karşılaştırması Çizelge 2.11’de sunulmaktadır:



Resim 2.20. ZTV01 molekülü için elde edilmiş konsantrasyon-zaman grafiği (0,6 mg’lık infüzyon için elde edilmiş deneysel IV değerleri $\square$ ile, tahmin edilen profil düz çizgi ile gösterilmektedir.)

Sonuçta, ZTV01 etkin maddesinin emilimi GastroPlus™’in PK modülü kullanılarak simüle edilmiştir. PKPlus modülünde 0,6 mg’lık IV infüzyonun plazma-konsantrasyon verileri kullanılmış ve klirens, emilim katsayısı gibi farmakokinetik parametreler hesaplanmıştır. Bu modelden elde edilen farmakokinetik parametreler kullanılarak uzun salımlı tablet için simülasyon çalışması yapılmış ve konsantrasyon zaman eğrisi elde edilmiştir (Resim 2.21).

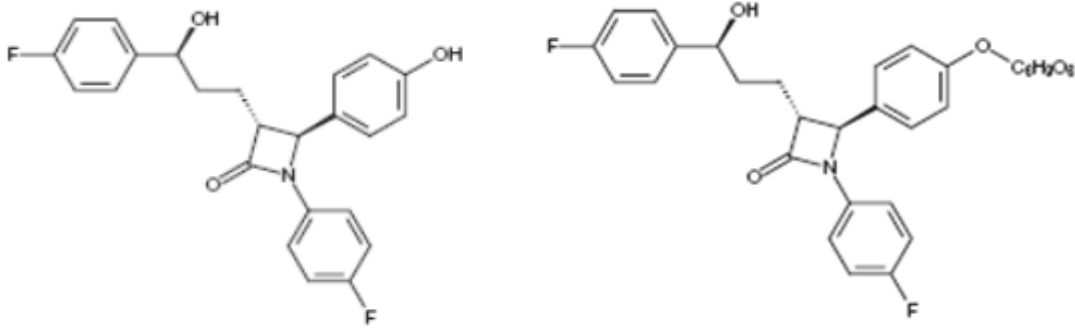


Resim 2.21. ZTV01 molekülünün kullanıldığı 10 mg'lık uzun salımlı tabletlerin konsantrasyon-zaman eğrisi (Oral plazma-konsantrasyon verileri □ ile, tahmin edilen profil düz çizgi ile gösterilmektedir.)

2.7. Etkin Madde Özellikleri

2.7.1. Kimyasal özellikler

Ezetimib, 1-(4-fluorophenyl)-3(R)-[3-(4-fluorophenyl)-3(S)-hydroxypropyl]-4(S)-(4-hydroxyphenyl)-2-azetidinone, molekül formülü $C_{24}H_{21}F_2NO_3$ olan 409,4 g/mol molekül ağırlığına sahip bir bileşiktir. Yapısında 3 şiral merkez bulunur. Bu merkezlerden 2 tanesi betalaktam halkası üzerindeyken, diğeri yan zincirde bulunur. Ezetimib oral yolla verildikten sonra vücut içersinde hızla metabolize edilerek farmakolojik olarak aktif olan glukuronid metabolitine dönüştürülür. Ezetimib glukuronidin kimyasal yapıları Şekil 2.14’de verilmiştir [1].



Şekil 2.14. Ezetimib ve ezetimib-glukuronidin kimyasal yapıları [1]

2.7.2. Görünüş ve erime özellikleri

Ezetimib beyaz-beyazımsı renkli, kristal yapıda bir tozdur. Erime noktası 163°C’dir [97].

2.7.3. Polimorfik özellikleri

Ezetimib, 2 polimorfik yapıda veya amorf halde bulunabilir. Polimorfları I ve II, H1 ve H2 veya A ve B olarak adlandırılır [97].

2.7.4. Çözünürlük özellikleri

Ezetimib suda pratik olarak çözünmez, etanol, metanol ve asetonunda yüksek oranda çözünür. Ezetimibin pK_a ’sı 9,66, oktanol/su partisyon katsayısı 4,5’dir [97].

2.7.5. Miktar tayini yöntemleri

Ezetimib miktar tayin yöntemi olarak HPLC kullanılmaktadır [98, 99, 100, 101].

2.7.6. Farmakolojik özellikleri

Ezetimib, oral yoldan kullanılan bir 2-azetidon yapılı antilipidemik bir ilaçtır. Tek başına veya 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-CoA) redüktaz inhibitörleriyle birlikte kullanılabilir. Diğer antihiperkolesterolemik ilaçlar safra salgısını artırıp (safra asidi bağlayıcılar), kolesterol sentezini bloke ederek (statinler) etki gösterirken, ezetimibin etki mekanizması daha farklıdır. HMG-CoA redüktaz inhibitör olarak bilinen statinlerle kombine edilerek hiperlipidemi tedavisinde kullanılır [102, 103, 104].

Ezetimib, kolesterol ve benzeri fitosterollerin bağırsaktan emilimini seçici olarak bloke eder. İnce bağırsakta, plika, villus ve mikrovilluslardan oluşan bölgeye lokalize olur ve etkisini gösterir. Ezetimib, kolesterolün emilimini inhibe edip, kolesterolün bağırsaklardan karaciğere geçişini engeller, böylece hepatik kolesterol depoları azalarak, kolesterolün kan klirensini artırır. Ezetimib tek başına, hiper kolesterolimli hastalarda ana olarak total kolesterol, LDL-kolesterol ve Apo-B düzeyini düşürür. Öte yandan trigliserid ve HDL-kolesterol düzeyleri üzerinde çok etkisi yoktur, aksine HDL-kolesterol düzeyini tipik olarak artırır [104].

2.7.7. Endikasyonları

Ezetimib primer hiperkolesterolemi (heterozigot ailevi ve ailevi olmayan hiperkolesterolemi), homozigot ailevi hiperkolesterolemi (HoFH), homozigotsitosterolemi (fitosterolemi) hastalıklarının tedavilerinde kullanılabilir. Ezetimib, primer hiperkolesterolemili hastalarda tek başına veya statinlerle birlikte toplam kolesterol, LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein)-kolesterol ve Apo-B'nin düşürülmesinde veya HDL (yüksek yoğunluklu lipoprotein)-kolesterol yükseltilmesinde diyetle ek olarak endikedir. HoFH'li hastalarda toplam kolesterol ve LDL-kolesterolün düşürülmesinde fitosterolemili hastalarda ise yükselmiş sitosterol ve kampesterol düzeylerinin düşürülmesinde etkilidir [105].

2.7.8. Kullanım şekli ve dozu

Ezetimib, oral yolla kullanılan tablet formunda bir ilaçtır. Lipid düşürücü diyetle birlikte 10 mg'lık tabletler aç veya tok karnına günün herhangi bir saati alınabilir. Ezetimib tek başına alınabildiği gibi, statin grubu bir ilaçla birlikte de kullanılabilir [104].

2.7.9. Farmakokinetik özellikleri

Emilim

Oral yolla uygulamadan sonra, ezetimib gastrointestinal kanaldan hızla emilir ve farmakolojik olarak aktif fenolik glukuronid metabolitine dönüştürülür. Yetişkin aç hastalara 10 mg'lık tablet uygulamasından sonra, ezetimib-glukuronidin 1-2 saat içinde, ezetimib ise 4-12 saat içersinde doruk plazma derişimine (C_{max}) ulaştığı görülmüştür. Ezetimib suda çözünmediği için mutlak biyoyararlanımı belirlenememiştir. Bağlı biyoyararlanımı değişken olmakla birlikte, AUC değeri %35-60'dır. Ezetimibin yarı ömrü 22 saattir [1].

AUC üzerinde yiyecek etkisi görülmez; ancak doruk plazma konsantrasyonu yağlı yiyeceklerle ilaç alımında % 38 artış gösterir [1].

Dağılım

Ezetimib ve ezetimib-glukuronid plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanır. Toplam ezetimib plazma proteinlerine %93,9-%94,5 oranında bağlanırken, ezetimib-glukuronid için bu oran %99,7'dir. Bu durum, kronik böbrek hastalıklarından veya karaciğer yetmezliğinden etkilenmez. İn vitro protein bağlanması toplam ezetimib için %87,8, ezetimibe-glukuronid için %92,0 oranındadır [1].

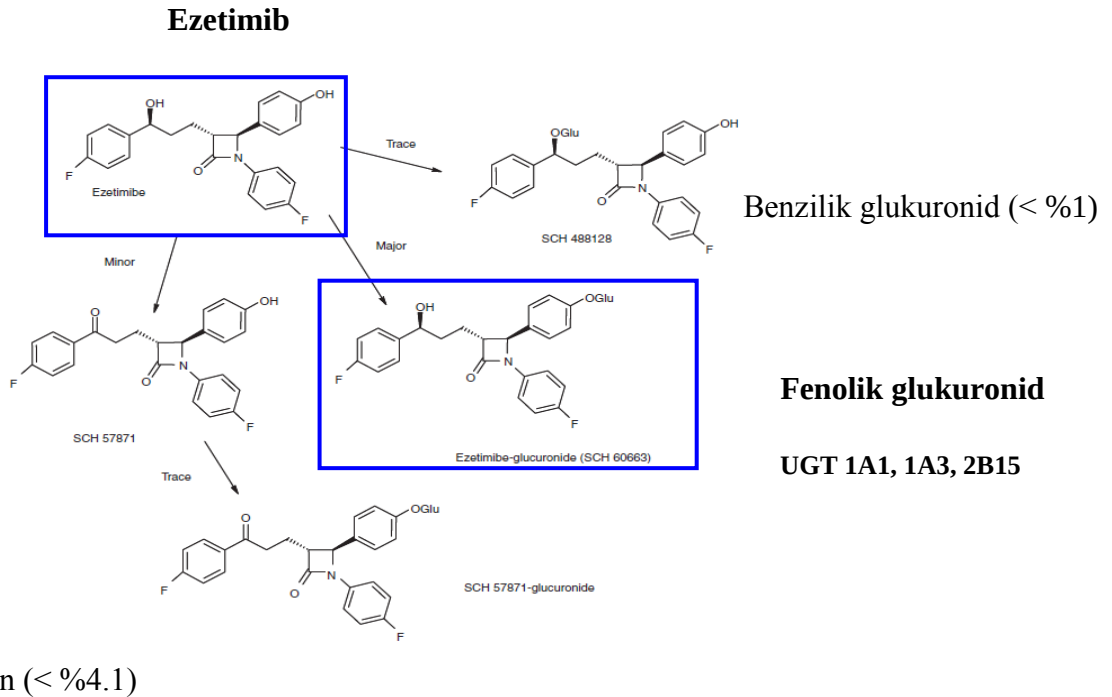
Biyotransformasyon

Oral yolla verilen ezetimib sistemik dolaşıma girmeden önce ince bağırsak mukozasında yüksek oranda dönüşüme uğrayarak aktif metaboliti olan fenolik glukuronide dönüştürülür. Ana dönüşme mekanizması, yapısında bulunan 4-hidroksifenil grubunun ince bağırsakta bulunan UGT1A1, UGT1A3 ve UGT2B15 enzimleri tarafından fenolik glukuronide çevrilmesidir. UGT2B7 tarafından da eser miktarda benzilik-glukuronid dönüşümü

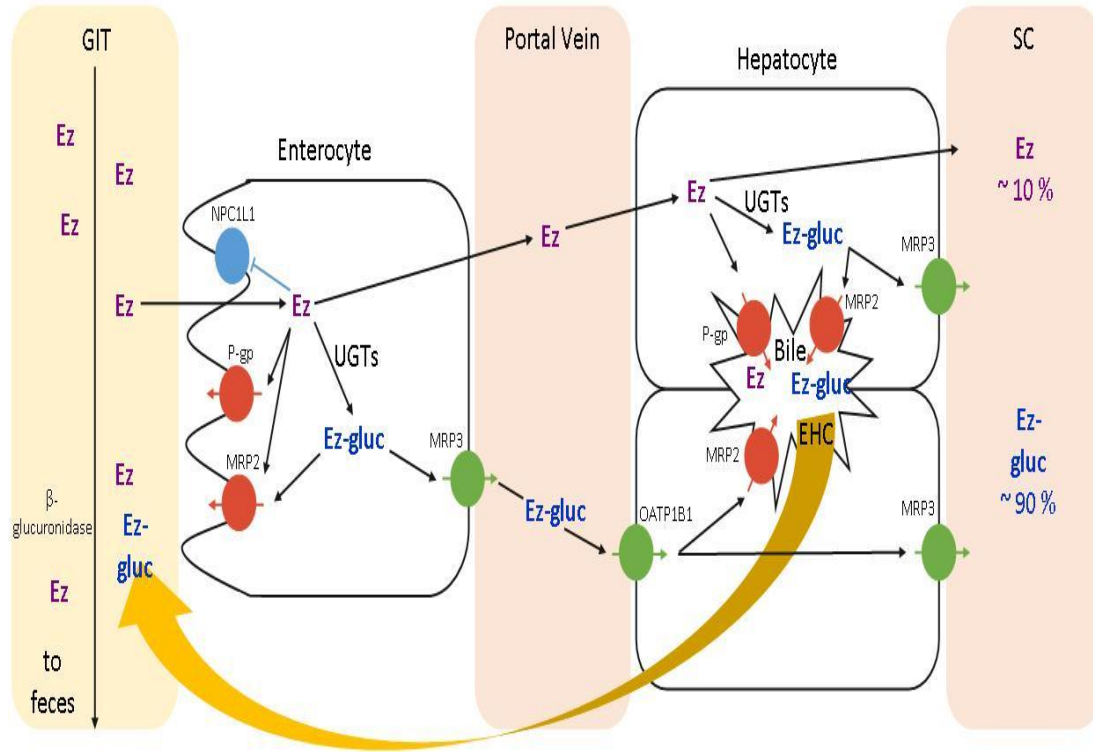
gerçekleştirilir. Ezetimibin bir diğer minör metaboliti (% 4,1'den küçük oranda bulunur) de keton yapısındadır ve bu metabolite ait fenolik glukuronide de idrar ve feçeste rastlanır [1].

UGT (UDP-glukuronosiltransferaz) enzimleri, hücre zarı üzerinde yer alan, glukuronik asidin nukleofilik substrata dönüşmesini sağlayan enzimlerdir. Bu enzimler, karaciğer, böbrek, ince bağırsakta ve steroid içeren dokularda bulunur. UGT enzimlerinin UGT1A, 2A ve 2B olmak üzere 3 alt grubu bulunur. Glukuronid metabolitlerinin sudaki çözünürlüğü ana ilaca göre daha yüksektir. UGT metabolitleri, safra veya böbrekler yoluyla MRP (multi-drug resistance) proteinleri tarafından atılabilir. Ayrıca, safrayla atılan glukuronid metabolitleri, enterohepatik sirkülasyona girerek, ince bağırsakta bulunan beta glukuronidaz enzimleri tarafından hidrolize uğrayarak yeniden ana ilaca dönüştürülür ve ince bağırsakta yeniden emilim görülür [106].

İnce bağırsakta gerçekleşen bu dönüşümden sonra, ana ilaç ve aktif metaboliti karaciğere taşınır. Ana ilacın glukuronide dönüştürme işlemi burada da devam eder. Ezetimib-glukuronid, daha sonra safrayla birlikte enterohepatik sirkülasyona girerek yeniden ince bağırsağa gönderilir [1]. Şekil 2.15 ve Resim 2.22'de ezetimibin glukuronide dönüşümü ve enterohepatik sirkülasyonu gösterilmektedir.



Şekil 2.15. Ezetimibin ezetimib-glukuronide dönüştürülmesi [1]



Resim 2.22. Ezetimibin enterohepatik sirkülasyonu

Ghosal ve diğerlerinin [107]'in mikrozom kullanarak yaptığı çalışmada, ezetimibe ait enzim kinetikleriyle ilgili Çizelge 2.12'de verilen bilgiler elde edilmiştir.

Çizelge 2.12. Ezetimibe ait enzim kinetikleri [107]

Kinetik parametre	UGT1A1	UGT1A3	UGT2B7
Fenolik/benzilik glukuronid	Fenolik	Fenolik	Benzilik
K_m (μM)	$64,3 \pm 17,2$	$41,7 \pm 15,4$	$20,9 \pm 4,05$
V_{max} (nmol/mg protein/dak)	$0,71 \pm 0,09$	$0,48 \pm 0,07$	$0,05 \pm 0,004$
V_{max}/K_m (nmol/mg protein/dak)	0,011	0,011	0,002

Atılım

Ezetimibin %1'den daha az bir kısmı üre ile atılırken, alınan dozun %69'u ezetimib-glukuronid hidrolizi ve emilmeyen ezetimib halinde feçes ile atılır. Dozun %4'lük bir kısmını oluşturan diğer keton metabolitine de idrar ve feçeste rastlanmıştır [1].

2.7.10. Ergen ve pediatrik hastalarda kullanım

Ezetimib, ergenler üzerinde (10-18 yaş) yetişkinlere benzer etki gösterir. 10 yaşından küçük hastalarda kullanımı konusunda ise yeterli veri bulunmamaktadır, bu nedenle ezetimibin pediatrik hastalarda kullanımı önerilmez [1].

2.7.11. Geriatrik hastalarda kullanım

Yapılan çalışmalarda, ezetimibin 10 mg'lık dozunun, geriatrik hastalar üzerinde etkinlik, güvenlik ve tolere edilebilirlik açısından fark yaratmadığı gösterilmiştir. Bu nedenle geriatrik hastalarda doz ayarlaması yapılmasına gerek yoktur [1].

2.7.12. Farklı cinsiyet ve ırklarda kullanım

Ezetimibin kadın ve erkekler üzerinde benzer farmakokinetik ve biyotransformasyon özellikleri gösterdiği saptanmıştır. Ezetimibin doruk plazma konsantrasyonu ve AUC'si kadınlarda erkeklere göre %20 daha fazladır; ancak bu durum klinik olarak anlamlı bir fark yaratmaz [1].

2.7.13. Böbrek ve karaciğer hastalarında kullanım

Böbrek yetmezliği hastalarında ezetimib maruziyeti %50 oranında artar. Ancak bu durum ezetimibin doz ayarlaması açısından klinik bir farklılık yaratmaz. Bu nedenle doz ayarlaması gerekmez.

Karaciğer hastalarında ezetimibin biyotransformasyonu arasında fark görülmezken, ezetimibe maruziyet 1,8-4,2 oranında artar. Orandaki artış, karaciğer hastalığının düzeyine bağlıdır. 10 mg'lık ezetimibin vücuttaki akümüasyonu da karaciğer hastalarında 3,5 kat daha fazladır. Karaciğer hastalarında ezetimibin akümüasyon oranı, glukuronidleşmesi miktarı ve plazma proteinlerine bağlanma oranı, doz ayarlaması gerektirmez. Ancak ezetimibe fazla maruziyetin bilinmeyen etkileri olabileceği için, bu hastalarda ezetimib kullanımı önerilmez [1].

2.7.14. Ezetimib için BCS Değerlendirmesi

Bölüm 2.4.1'de anlatılan BCS sınıflandırma sistemine göre ezetimib, düşük çözünürlük ve yüksek permeabilite özelliğine sahip bir molekül olup BCS Sınıf 2'ye aittir. Ezetimib

fizyolojik pH aralığında iyonlaşmaz [102]. BCS alt sınıflandırmasına göre pH 2'deki ve pH 6,5'daki çözünürlüğünün düşük, permeabilitesinin yüksek olmasından dolayı BCS Sınıf 2c'ye dahil edilebilir. Safra tuzları ve fosfolipitler bu gruptaki ilaçların in vitro çözünme hızları üzerinde etkilidir [30, 108]. Bu nedenle, ezetimib için yüzey etkin madde içeren klasik in vitro çözünme ortamları yanı sıra biyouyumlu çözünme ortamlarının değerlendirilmesinin uygun olacağı düşünülmüştür.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal maddeler

Ezetimib	DEVA İlaç, Türkiye
Ezetrol 10 mg tablet (Lot no: 301635)	MSD, Belçika
Ezetimib 10 mg tablet (Lot no: Pilot 02)	Zentiva, Türkiye
Sodyum hidroksit	Merck, Almanya
Glasiyel asetik asit	Merck, Almanya
Sodyum klorür	Merck, Almanya
SIF Powder®	Phares, İsviçre
Sodyum asetat trihidrat	Merck, Almanya
Asetonitril	Panreac, İspanya
Sodyum lauril sülfat	Merck, Almanya
Amonyum asetat	Panreac, İspanya
Fosforik asit	Sigma-Aldrich, İspanya

3.1.2. Araç ve gereçler

pH metre	Metrohm, ABD
Ultrasonik banyo	Bandelin Sonorex, Almanya
Hassas terazi	Mettler Toledo, İsviçre
Etüv	Heareus, Thermo Fisher Scientific, USA
In vitro çözünme hızı aleti (Palet)	Vankel, Agilent Technologies, ABD
Manyetik karıştırıcı	Heidolph, Almanya
HPLC	TSP, Thermo Finnigan, ABD
HPLC	Waters, Alliance, ABD
GastroPlus™ 8.0	Simulations Plus, ABD
ADMET Predictor™	Simulations Plus, ABD

3.2. Yöntem

3.2.1. In vitro çözünme ortamlarının hazırlanması

pH 2,8 tamponu

8,97 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ve 4,5 g SLS 1 litrelik balonjojeye tartılır ve bir miktar distile su ile çözülüp hacmine tamamlanır, pH fosforik asit ile $2,8 \pm 0,5$ 'e ayarlanır.

pH 4,5 tamponu (FDA ortamı)

2,99 gr $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 4,5 gr SLS bir miktar saf distile çözülür. Üzerine 14 mL 2N asetik asit eklenir. Distile su ile 1 litre hacmine tamamlanır.

pH 6,8 tamponu

1,58 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ve 4,5 g SLS 1 litrelik balonjojeye tartılır ve bir miktar distile su ile çözülüp hacmine tamamlanır. pH, NaOH çözeltisi ile $6,8 \pm 0,5$ 'e ayarlanır.

FaSSIF ortamı

Kör FaSSIF

0,42 g NaOH pelletleri, 3,95 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 6,19 g NaCl, distile suyla 1L'ye tamamlanır ve pH 1N HCl /NaOH ile 6,5'a ayarlanır. 2,24 g SIF Powder® 500 mL Kör FaSSIF ortamında çözülür ve hacim kör FaSSIF ortamıyla 1 L'ye tamamlanır. Çözelti dengeye gelmesi için 2 saat oda sıcaklığında bekletilir.

FeSSIF ortamı

Kör FeSSIF: 4,04 g NaOH pelletleri, 8,65 g glasiyel asetik asit, 11,87 g NaCl, distile suyla 1L'ye tamamlanır ve pH 1N HCl /NaOH ile 5,0'a ayarlanır. 11,2 g SIF Powder® 500 mL Kör FaSSIF ortamında çözülür ve hacim kör FaSSIF ortamıyla 1 L'ye tamamlanır.

3.2.2. Ezetimib 10 mg tablet in vitro çözünme hızı metot validasyonu

Ezetimib 10 mg tablet için ICH Q2 (R1) Kılavuzu'nda [109] önerildiği şekilde, HPLC yöntemi kullanılarak in vitro çözünme hızı metot validasyonu gerçekleştirilmiştir. Metot

validasyonu kapsamında öncelikle UV’de dalga boyu taraması yapılmış, daha sonra doğrusalılık, doğruluk ve geri elde, tekrar edilebilirlik, özgünlük ve seçicilik, kesinlik ve stabilite parametreleri değerlendirilmiştir. Çalışmalarda kullanılan kromatografik sistemin detayları, mobil faz ve standart hazırlanışları aşağıda sunulmaktadır:

HPLC kromatografik sistemi

Kolon: Inertsil ODS 3 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm)

Dedektör: 230 nm, UV

Akış hızı: 1,5 mL/min

Enjeksiyon hacmi: 100 µL

Kolon sıcaklığı: 25 °C

Otosampler sıcaklığı: 25 °C

Numuneleme hızı: 2 nokta/sn

Tutulma zamanı: 5 dak

HPLC kalibrasyonlarında ezetimib konsantrasyonlarına karşı pik alanları değerlendirilmiştir.

Mobil faz

Mobil faz: 500 mL 10 mM amonyum asetat tamponu + 500 mL asetonitril

Mobil Faz Hazırlanışı: 500 mL amonyum asetat tamponu ve 500 mL asetonitril karıştırılarak hazırlanır.

10 mM Amonyum Asetat Tamponu Hazırlanışı: 0,771 g amonyum asetat 1 L saf su ile çözülür.

Ezetimib standart çözeltisinin hazırlanışı

10 mg ezetimib standardı 25 mL’lik balon jojeye tartılır ve asetonitril ile hacmine tamamlanır. 10 dakika ultrasonik banyoda tutulur. Çözelti hacminin 25 mL çizgisine inmesi beklenir. Bu çözeltinin 5 mL’si 100 ml’lik balon jojeye tartılır, çözünme vasatıyla hacmine tamamlanır ve 0,45 µm’lik filtreden (Macherey-Nagel Chromafil PRT-45/25 Polyester) süzülür.

UV taraması

Ezetimibin hazırlanan pH 2,8 + SLS, pH 4,5 + SLS, pH 6,8 + SLS, Kör FaSSIF, FaSSIF, Kör FeSSIF, FeSSIF ortamlarında 20 µg/mL derişiminde çözeltileri hazırlandı. 190 – 400 nm arasında kör çözeltilisine karşı spektrumları alındı ve $\lambda_{\max}$ değerleri saptandı. Ezetimibin çözünlüğü pH 1,2 ortamında sink koşulu sağlamadığı için in vitro çalışmalarda bu pH kullanılmamıştır.

In vitro çözünme hızı metot validasyonu parametreleri

In vitro çözünme ortamlarında standart doğrunun elde edilmesi (doğrusallık)

Bir analitik yöntemin doğrusallığı, belirli bir aralık içinde, numunedeki analit konsantrasyonu ile doğru orantılı test sonuçları elde etme kapasitesini gösterir. Ezetimib doğrusallık çalışmasında, 5 ayrı in vitro çözünme ortamında (pH 2,8+SLS, pH 4,5+SLS, pH 6,8+SLS, FaSSIF, FeSSIF) doğrusallık çalışması yapılmış ve bu ortamlardaki standart doğrular elde edilmiştir. Bunun için, 40 µg/mL derişiminde (%200'lük) hazırlanan stok çözeltiliden uygun seyreltmeler yapılarak 12 – 24 µg/mL derişimlerinde çözeltiler hazırlandı. Tüm çözünme ortamlarında, önceden belirlenmiş $\lambda_{\max}$ 'ta bu derişimlere karşılık gelen alan değerleri hesaplandı. Alan değerleri hesaplanırken, %60, %100 ve %120'lik konsantrasyonlar için 5'er enjeksiyonun; %70, %80, %90, %110'luk konsantrasyonlar için ise 2'şer enjeksiyonun alanlarının ortalamaları alındı.

Doğruluk ve geri elde

Doğruluk parametresi, bulunan değerler ile gerçek değer arasındaki yakınlığı ifade eder. Bu amaçla, etkin maddenin 3 ayrı derişimde (%60, %90, %120) geri elde etme çalışması yapıldı. Üç paralel olarak yapılan çalışmalarda standart ezetimib konsantrasyonun (20 µg/mL) %60, %90 ve % 120'sine karşılık gelen miktarlar 100 mL'lik balon jojelere tartıldı. Ayrıca, tüm balon jojelere bir tabletin içerdiği miktara karşılık gelen miktarlarda plasebo tartıldı. Numuneler %5 asetonitril içeren çözünme ortamlarında çözüldü ve standarda karşı alan değerleri, standart sapma ve % varyasyon katsayısı (VK) hesaplandı.

Tekrar edilebilirlik

20 µg/mL derişiminde hazırlanan numune arka arkaya 10 kere analiz edildi. Alana karşılık gelen konsantrasyon değerleri ve enjeksiyonlar arasındaki % VK hesaplandı.

Özgünlük ve seçicilik

Seçicilik, var olduğu kabul edilen bileşenler içerisinde, analitin net bir biçimde tayin edilebiliyor olmasıdır. Bu amaçla, kullanılan HPLC yönteminin sadece analiz edilen ezetimibi saptadığı gösterilmiştir. Çözünme ortamları, standart çözeltileri, çözünme hızı numuneleri ve plasebo çözeltilerinin kromatogramları alınmış ve karşılaştırılmıştır.

Kesinlik

Bir analitik metodun kesinliği, belirli koşullar altında aynı numunenin çoklu hazırlıklarından elde edilen bir dizi ölçüm arasındaki uygunluğu belirtir. Kesinlik, tekrarlanabilirlik, ortam kesinliği ve tekrar elde edilebilirlik parametreleriyle değerlendirilir.

Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, kısa bir zaman aralığı içinde aynı uygulama koşulları altındaki kesinliği ifade eder. Ezetimib disolüsyon metodunun tekrarlanabilirliğini göstermek için tek bir çözünme hızı beherinden 6 kere numune alınmış ve analiz edilmiştir. Bunun yanında, 6 beherden 20. dakikada da örnekleme yapılmıştır. Alınan numuneler arasındaki %VK'nın %2'den küçük olması gereklidir.

Ortam kesinliği

Ortam kesinliği, laboratuvar içindeki farklı günler, farklı analistler, farklı cihazlar gibi değişimleri ifade eder. Farklı analistler ve farklı cihazlar arasındaki farkın $\leq$ %10'dan küçük olması gerekir. Ezetimib çözünme hızı metodunda ortam kesinliğini göstermek amacıyla farklı günlerde farklı cihazlarda çözünme hızı çalışması yapılmıştır.

Tekrar elde edilebilirlik

Tekrar elde edilebilirlik iki laboratuvar arasındaki kesinliği ifade eder.

Stabilite

Ezetimibin in vitro çözünme ortamlarındaki kararlılığının incelenmesi amacıyla FaSSIF ve FeSSIF ortamlarda 20 µg/mL derişimlerde standart çözeltileri hazırlandı ve oda

sıcaklığında ve $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat bekletildi. 2 paralel olarak hazırlanan standart çözeltilerinden 24 ve 48. saatlerde örnekleme yapılarak derişimler belirlendi.

3.2.3. Çözünürlük

Ezetimibin FaSSIF ve FeSSIF çözünme ortamlarındaki çözünürlüğünün belirlenmesi amacıyla, 20 mL'lik çözünme ortamına, çözebileceğinden aşırı miktarda ezetimib katıldı. 3 paralel olarak hazırlanan erlenler $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ sıcaklıktaki su banyosunda bekletildi ve belirli zamanlarda örnekler alındı. Alınan örnekler 0,45 μm 'lik PET (Macherey-Nagel Chroafil PET-45/25 polyester) filtreden süzöldükten sonra HPLC'de analizi yapıldı.

3.2.4. In vitro çözünme hızı deneyleri

Ezetimib 10 mg tablet in vitro çözünme hızı sistemi

Zentiva Sağlık Ürünleri'ne ait Ezetimib 10 mg Tablet (Lot no: Pilot 02) ve MSD'ye ait Ezetrol 10 mg Tablet (Lot no: 301635, Belçika) ile gerçekleştirilen in vitro çözünme hızı test koşulları

Çizelge 3.1'de verilmiştir:

Çizelge 3.1. İn vitro çözünme hızı test koşulları

Yöntem	Palet Yöntemi
Çözünme Ortamı	pH 2,8 + 0,45% SLS, pH 4,5 + 0,45% SLS (FDA ortamı), pH 6,8 + 0,45% SLS, FaSSIF, FeSSIF
Ortam Hacmi	500 mL
Dalga Boyu	230 nm
Ortam Sıcaklığı	$37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$
Tablet Sayısı	n=12
Hız	50 rpm
Deney Süresi	60 dakika
Örnekleme Süreleri	5, 10, 15, 20, 30, 45 ve 60. dakika

Paletler kapların tabanından 2,5 cm yüksekte olacak şekilde yerleştirildi. İn vitro çözünme ortamları hücrelere dolduruldu. Tabletler hücrelere atılarak yukarıda belirtilen koşullarda deneyler yapıldı. Belirtilen zaman aralıklarında tüm hücrelerden alınan 2 mL numune, 0,45µm'lik PET filtreden süzöldükten sonra HPLC'de miktar tayini yapıldı. Elde edilen pik alanları derişime çevrildi ve yüzde çözönen ezetimib miktarları hesaplandı.

İn vitro çözünme hızı sonuçlarının karşılaştırılması

İn vitro çözünme hızı profillerinin benzerliği Eşitlik 3.1'de formölü verilen f_2 benzerlik faktörüne göre yapılır.

$$f_2 = 50 \cdot \log \left(\left[1 + (1/n) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \cdot 100 \right) \quad (3.1)$$

İki profilin benzer kabul edilebilmesi için f_2 değerin ≥ 50 olması gereklidir. Bu değeri, iki eğri arasında %10'dan daha düşük bir farklılık olduğunu gösterir. Bu değeriendirmede, 12'li profil çalışmasında elde edilen ortalama değeri kulanılır. Varyasyon katsayısının 10.dakikaya kadar en fazla %20, daha sonra ise en fazla %10 olması gereklidir. Hesaplama yapılırken %85'i geçeri 1 nokta hesaba katılır. % çözönen oranının 15 dakikada %85'i geçtiği durumlarda f_2 değeriendirmesi yapılmasına gerek yoktur [21].

3.2.5. GastroPlus™'la yapılan simülasyon çalışmaları

Simülasyon çalışmalarında, in vitro, in siliko ve in vivo veriler kullanılmıştır.

İn vitro çalışmalar,

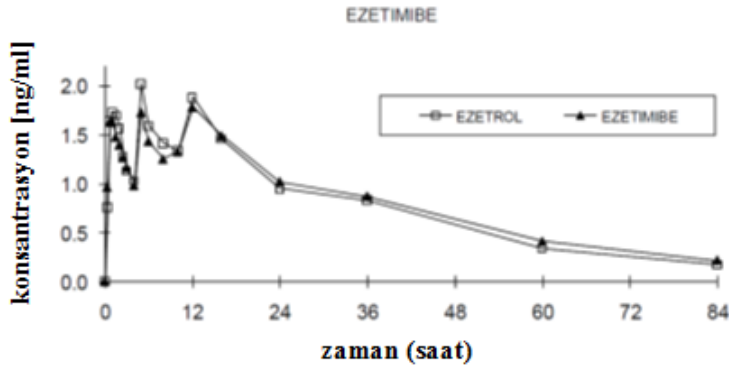
İn vitro çalışmalar, biyoyumlu ortamlarda gerçekleştirilen çözünürlük ve in vitro çözünme hızı çalışmalarını kapsamaktadır.

İn siliko çalışmalar

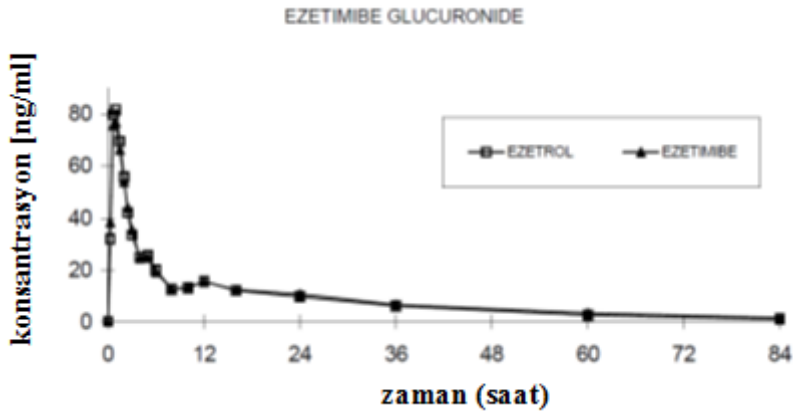
İn siliko çalışmalar, ADMET Predictor™'ın 6.5 versiyonunda yapılmıştır. Programa, ezetimibin molekül yapısı girilmiştir ve moleküle ait pK_a , $\log P/\log D$, efektif permeabilite (P_{eff}), biyoyumlu ortamlardaki çözünürlük değerleri, kan/plazma konsantrasyon oranı, kan plazma proteinlerine bağlanma oranı gibi parametreler in siliko olarak hesaplanmıştır.

In vivo veriler

In vivo veriler, Zentiva Sağlık Ürünleri'ne ait Ezetimib 10 mg tablet (Lot no: Pilot 01) test ürünü ve Merck Sharp Dohme'a ait Ezetrol 10 mg tablet (Belçika, Lot no: 301635) ürünleri için 18-55 yaş arası, 44 erkek gönüllü üzerinde, açlık durumunda gerçekleştirilmiş olan tek dozlu, iki yönlü, çapraz biyoeşdeğerlik çalışmasında elde edilmiş plazma konsantrasyon verileridir. Bu çalışmada, örnekleme 0; 0,33; 0,67; 1,00; 1,50; 2,00; 2,50; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 16; 24; 36; 60 ve 84. saatlerde yapılmıştır. Alınan örneklerde, plazmadaki toplam ezetimib ve aktif metaboliti olan ezetimib-glukuronid miktarları ölçülmüştür. Test ve referans ürünleri için toplam ezetimib ve ezetimib glukuronid plazma konsantrasyonu-zaman eğrileri Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de gösterilmektedir.



Şekil 3.1 Test ve referans ürünleri plazma konsantrasyonu-zaman eğrileri (toplam ezetimib)



Şekil 3.2 Test ve referans ürünleri plazma konsantrasyonu-zaman eğrileri (ezetimib glukuronid)

Biyoeşdeğerlik çalışması sonuçları

Ezetimib 10 mg tablet ve Ezetol 10 mg tablet ürünlerinin biyoeşdeğerliği 44 sağlıklı erkek gönüllü üzerinde açlık durumunda, iki yönlü, çapraz tasarımlı çalışmayla gösterilmiştir. Çizelge 3.2’te biyoeşdeğerlik çalışması sonuçları sunulmaktadır:

Çizelge 3.2 Biyoeşdeğerlik çalışması sonuçları

	Ezetimibe 10 mg tablet	Ezetrol 10 mg tablet	Ezetimibe/Ezetrol
AUC_(0-t) (µg,saat/L)	61,3	58,8	%104,2
% 90 güven aralığı: %98,4 - %110,4			
AUC_(0-inf) (µg,saat/L)	68,3	67,4	%105,6
% 90 güven aralığı: %98,7 - %113,0			
C_{max} (ng/mL)	2,40	2,52	%95,0
% 90 güven aralığı: %86,6 - %104,1			
t_{1/2} (saat)	21,6	20,7	%104,1
% 90 güven aralığı: %96,0 - %112,9			

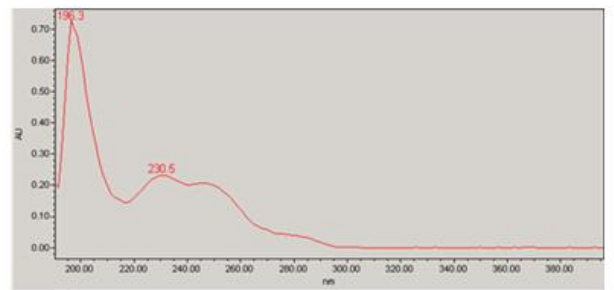
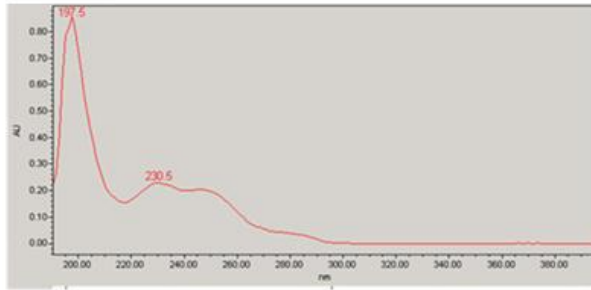
4. BULGULAR

4.1. HPLC spektrumu

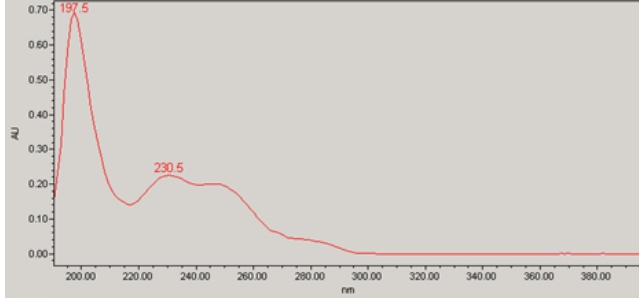
Ezetimibin hazırlanan pH 2,8 + SLS, pH 4,5 + SLS, pH 6,8 + SLS, Kör FaSSIF, FaSSIF, Kör FeSSIF, FeSSIF ortamlarındaki HPLC spektrumları Şekil 4.1 Şekil 4.4'te, $\lambda_{\max}$ değerleri ise Çizelge 4.1'de sunulmaktadır.

Çizelge 4.1. Ezetimibin maksimum absorbans verdiği $\lambda_{\max}$ değerleri

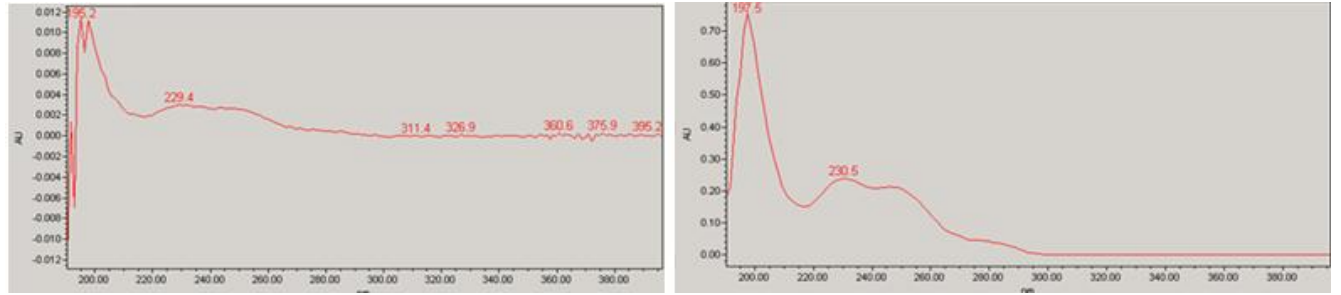
Çözünme Ortamı	$\lambda_{\max}$ (nm)
pH 2,8 + SLS	230,5
pH 4,5 + SLS	230,5
pH 6,8 + SLS	230,5
Kör FaSSIF	230,5
FaSSIF	230,5
Kör FeSSIF	229,4
FeSSIF	230,5



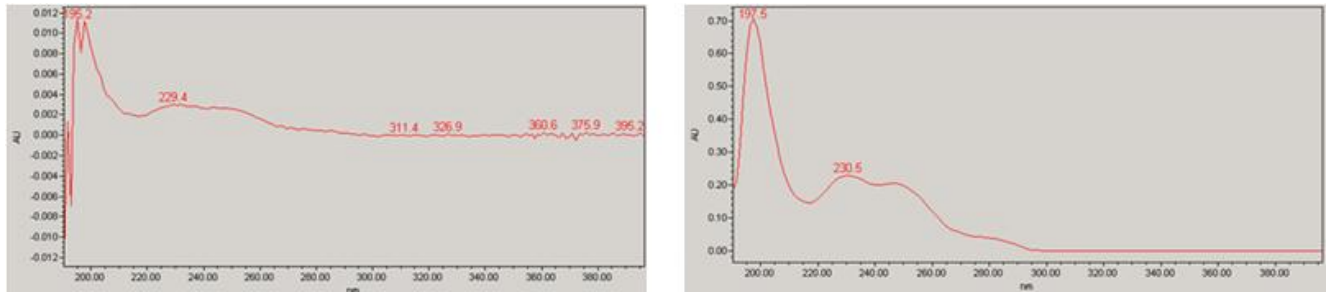
Şekil 4.1. pH 2,8 + SLS ve pH 4,5 + SLS in vitro çözünme ortamlarındaki HPLC spektrumları



Şekil 4.2. pH 6,8 + SLS in vitro çözünme ortamındaki HPLC spektrumu



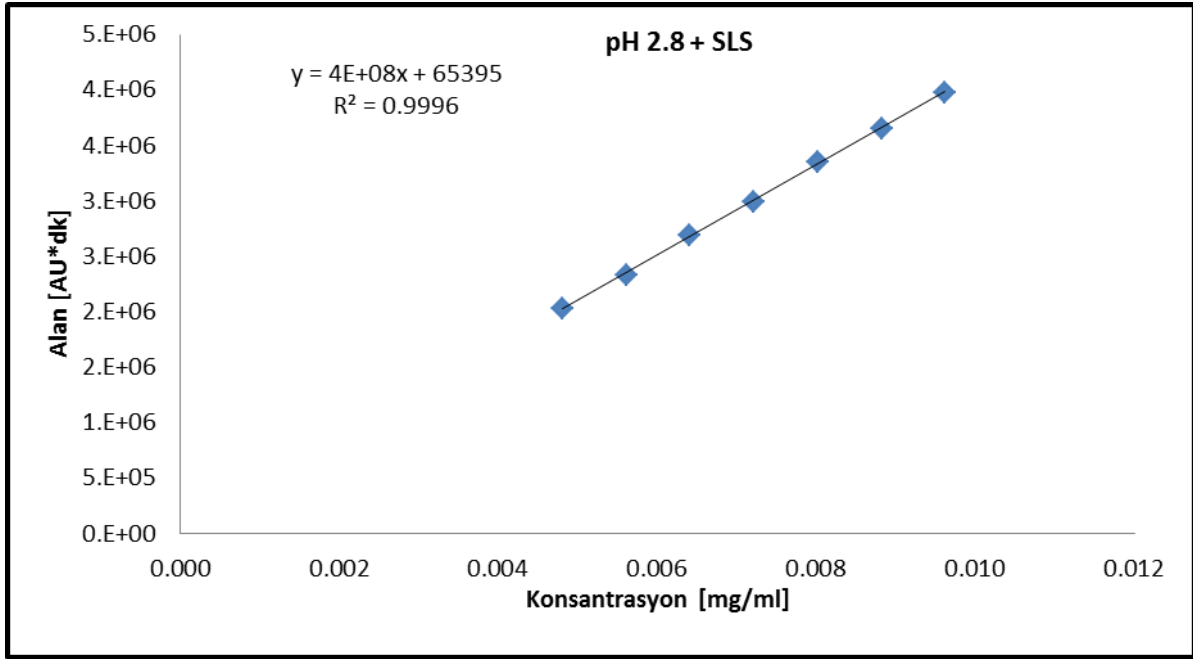
Şekil 4.3. Kör FaSSIF ve FaSSIF çözünme ortamlarındaki HPLC spektrumları



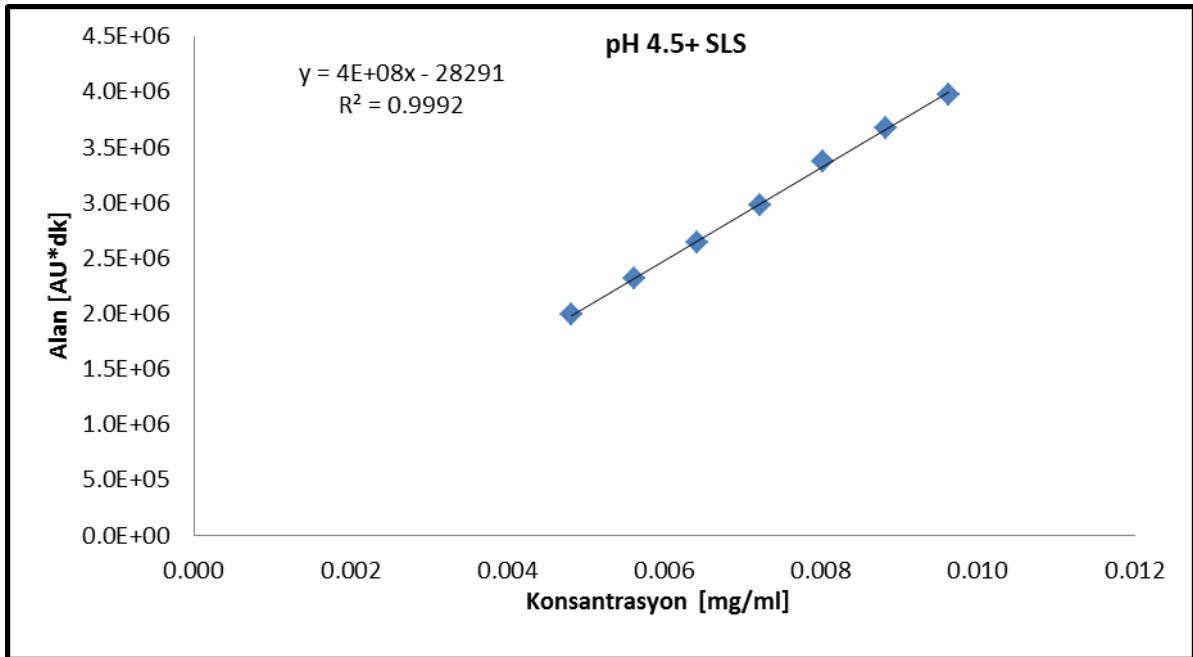
Şekil 4.4. Kör FeSSIF ve FeSSIF çözünme ortamlarındaki HPLC spektrumları

4.2. In vitro çözünme ortamlarındaki standart doğrulara ait bulgular

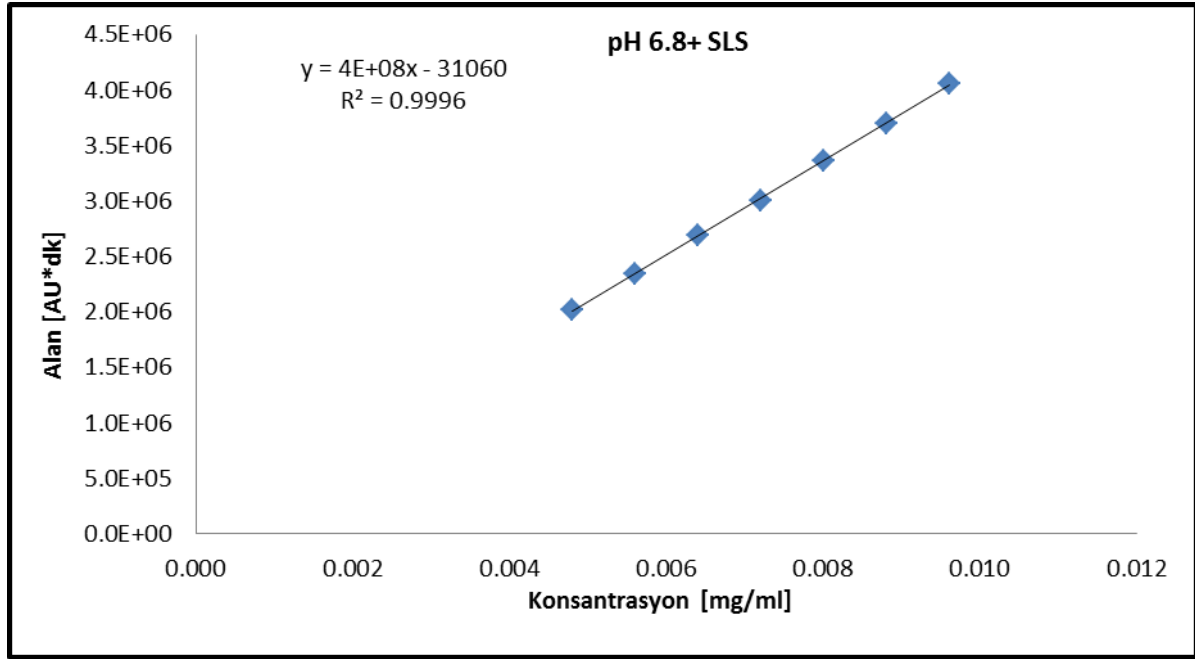
Ezetimib standart doğruları 733.2.2’de anlatıldığı şekilde çıkarılmıştır. pH 2,8 + % 0,45 SLS, pH 4,5 + 0,45 SLS, pH 6,8 + 0,45 SLS, FaSSIF, FeSSIF ortamlarındaki standart doğrular ilerleyen bölümde sunulmaktadır. Regresyon değerlendirmesine göre R^2 değerleri tüm doğrular için 0,999 olarak hesaplanmıştır. Tüm ortamlarda elde edilmiş standart doğrular Şekil 4.5 Şekil 4.9’da gösterilmektedir.



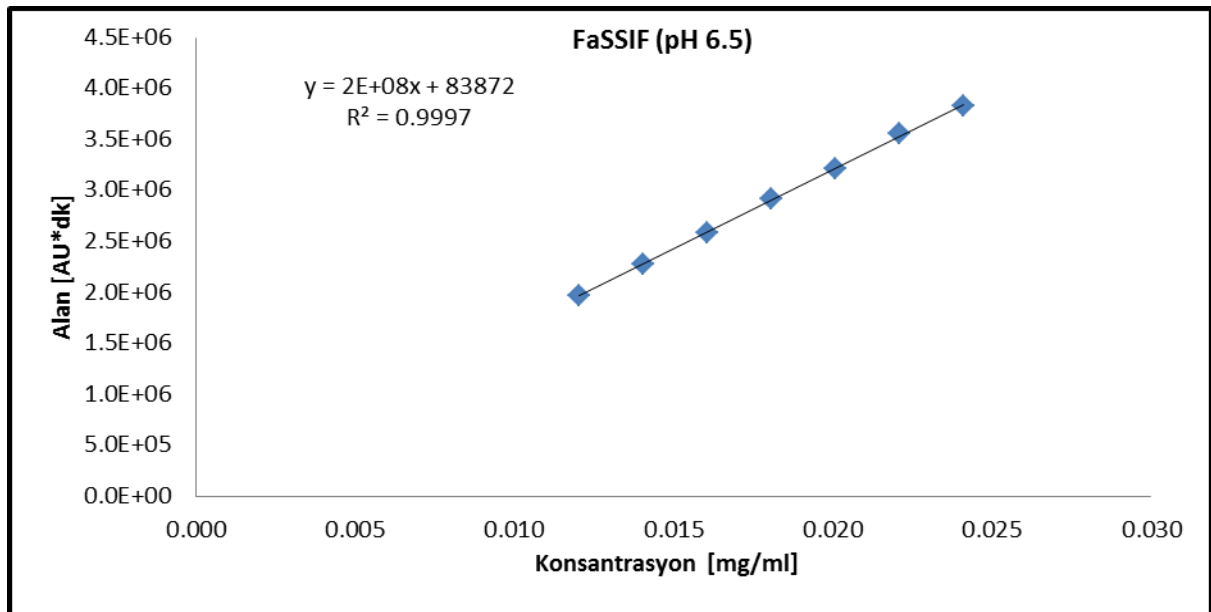
Şekil 4.5. Ezetimibin pH 2,8 + %0,45 SLS in vitro çözünme ortamındaki standart doğrusu



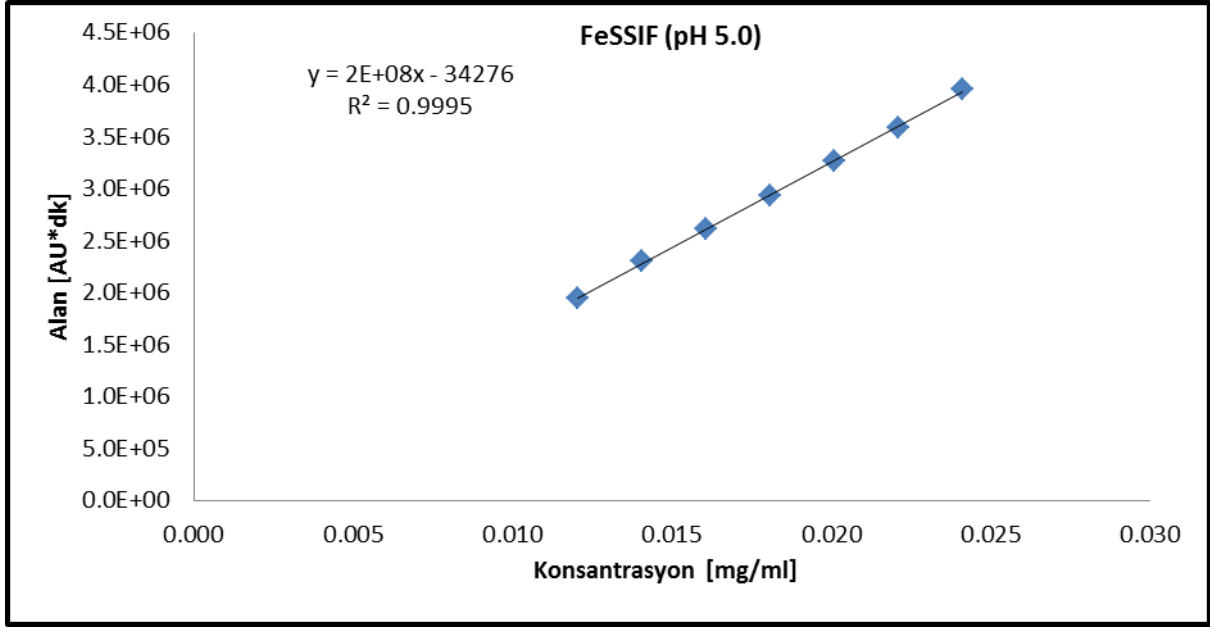
Şekil 4.6. Ezetimibin pH 4,5 + %0,45 SLS in vitro çözünme ortamındaki standart doğrusu



Şekil 4.7. Ezetimibin pH 6,8 + %0,45 SLS in vitro çözünme ortamındaki standart doğrusu



Şekil 4.8. Ezetimibin FaSSIF in vitro çözünme ortamındaki standart doğrusu



Şekil 4.9. Ezetimibin FeSSIF in vitro çözünme ortamındaki standart doğrusu

4.3. Doğruluk ve geri elde

Doğruluk ve geri elde çalışması 3.2.2’de anlatıldığı gibi yapılmış olup sonuçlar Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3’te gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. FaSSIF ortam için ezetimib geri eldesi

Teorik Derişim (µg/mL)	Hesaplanan Derişim (µg/mL)	% Geri Elde	X_{ort}	SS	%VK
12	12,49	100,04	99,55	1,2	1,23
12	12,00	98,16			
12	12,38	100,45			
18	18,40	100,22	100,52	0,6	0,62
18	18,48	101,23			
18	18,43	100,11			
24	24,31	99,67	98,25	1,5	1,55
24	23,51	96,65			
24	23,38	98,42			

Çizelge 4.3. FeSSIF ortam için ezetimib geri eldesi

Teorik Derişim (µg/mL)	Hesaplanan Derişim (µg/mL)	% Geri Elde	X _{ort}	SS	%VK
12	11,98	98,97	99,11	0,2	0,22
12	12,38	99,00			
12	12,42	99,36			
18	18,20	98,35	98,32	0,4	0,36
18	18,25	98,65			
18	17,93	97,95			
24	24,00	98,36	98,32	0,1	0,09
24	24,01	98,38			
24	23,97	98,22			

4.4. Tekrarlanabilirlik

Ezetimibe ait tekrarlanabilirlik sonuçları FaSSIF ve FeSSIF ortamlar için Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5’te verilmiştir.

Çizelge 4.4. FaSSIF ortamdaki tekrarlanabilirlik sonuçları

Örnek	Teorik Derişim (µg/mL)	Alan	%	Hesaplanan Derişim (µg/mL)
1	20,1	3302480	99,68	20,06
2	20,1	3299892	99,60	20,05
3	20,1	3303108	99,70	20,07
4	20,1	3295503	99,47	20,02
5	20,1	3291478	99,35	20,00
6	20,1	3292857	99,39	20,01
7	20,1	3293407	99,41	20,01
8	20,1	3289795	99,30	19,99
9	20,1	3284418	99,14	19,95
10	20,13	3284108	99,13	19,95
X _{ort}		3293705	99,42	20,01
SS		6719,3	0,2	0,0
%VK		0,2	0,2	0,2

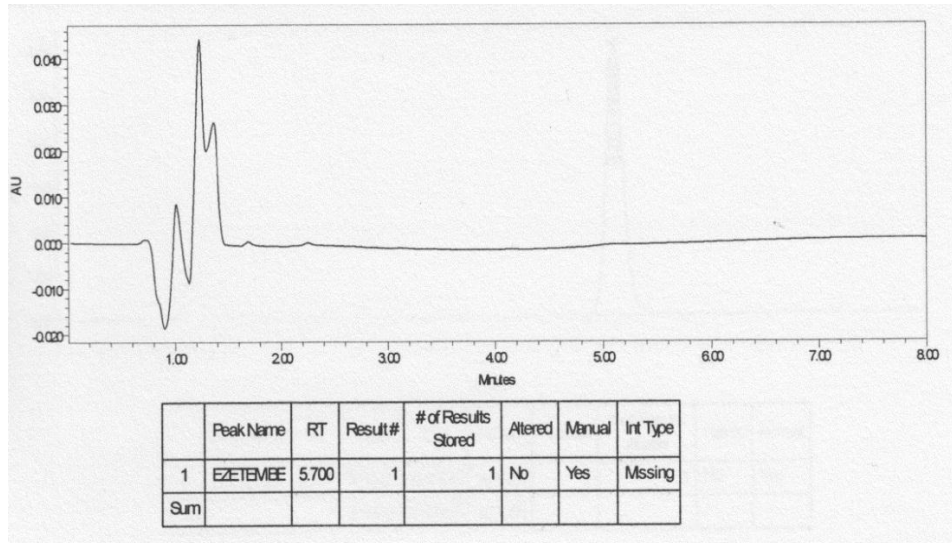
Çizelge 4.5. FeSSIF ortamdaki tekrarlanabilirlik sonuçları

Örnek	Teorik Derişim (µg/mL)	Alan	%	Hesaplanan Derişim (µg/mL)
1	20,13	3277536	98,57	19,88
2	20,13	3270743	98,37	19,84
3	20,13	3263746	98,16	19,80
4	20,13	3257650	97,98	19,76
5	20,13	3251136	97,78	19,72
6	20,13	3238908	97,41	19,65
7	20,13	3233891	97,26	19,62
8	20,13	3221303	96,88	19,54
9	20,13	3212921	96,63	19,49
X_{ort}		3247537	97,67	19,70
SS		22258,6	0,7	0,1
%VK		0,7	0,7	0,7

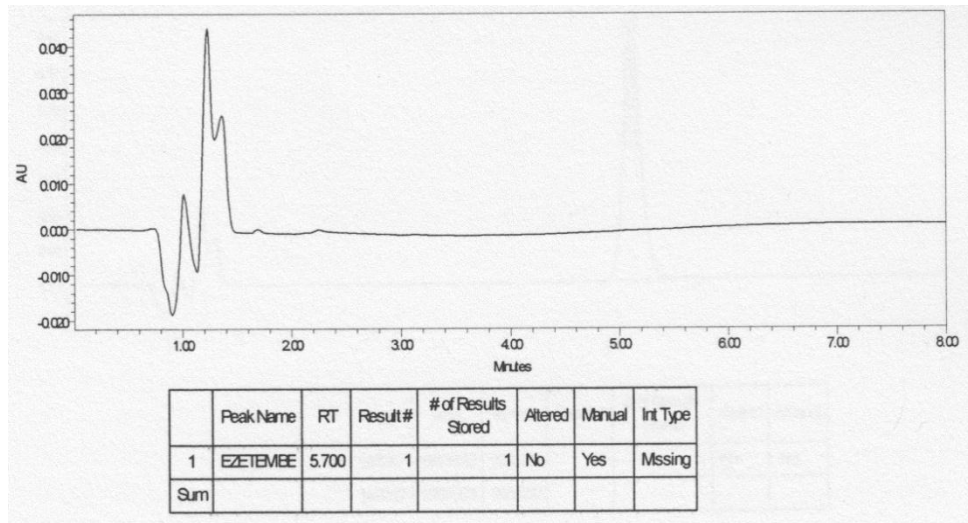
4.5. Özgünlük ve seçicilik

Kullanılan HPLC yönteminin sadece analiz edilen ezetimibi saptadığı FaSSIF/FeSSIF çözünme hızı ortamları, standart çözeltileri, çözünme hızı numuneleri ve plasebo çözeltilerinin kromatogramları karşılaştırılarak gösterilmiştir. FaSSIF ortamında yapılan çalışmalar Şekil 4.10 - Şekil 4.13'te, FeSSIF ortamında yapılan çalışmalar ise Şekil 4.14-Şekil 4.17'de gösterilmektedir.

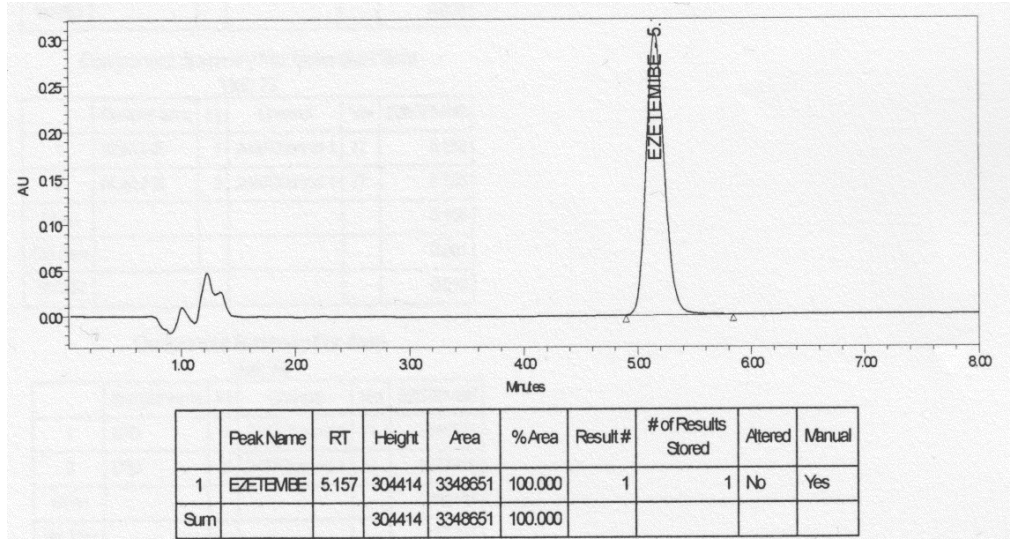
FaSSIF ortamında yapılan çalışmalar



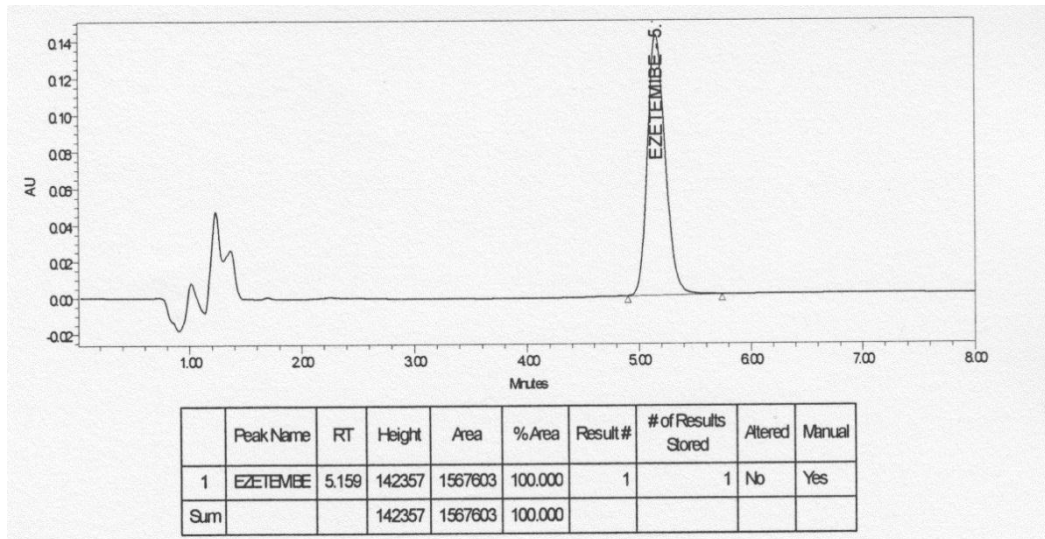
Şekil 4.10. FaSSIF ortamının kromatogramı



Şekil 4.11. FaSSIF ortamındaki plasebo çözeltisinin kromatogramı

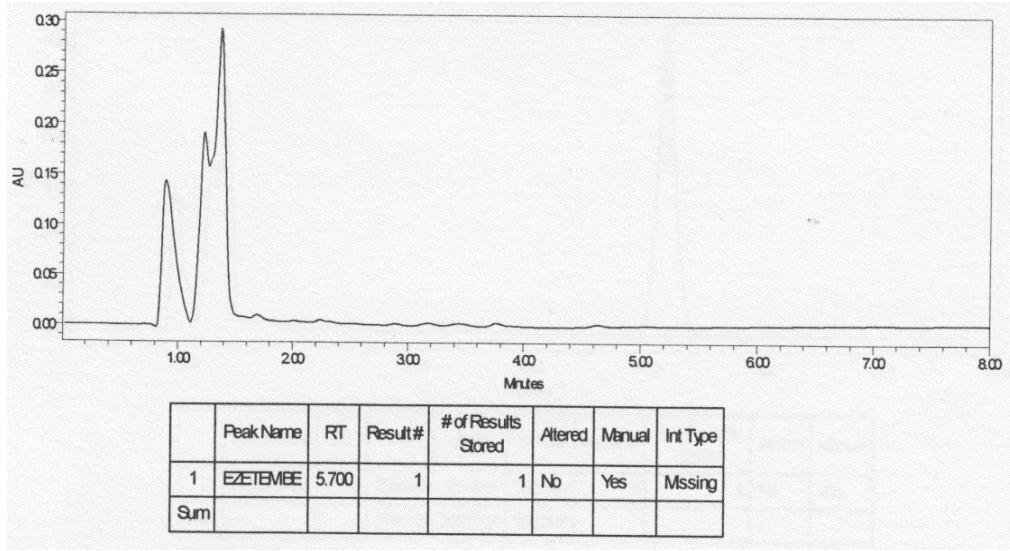


Şekil 4.12. FaSSIF ortamındaki standart çözeltisinin kromatogramı

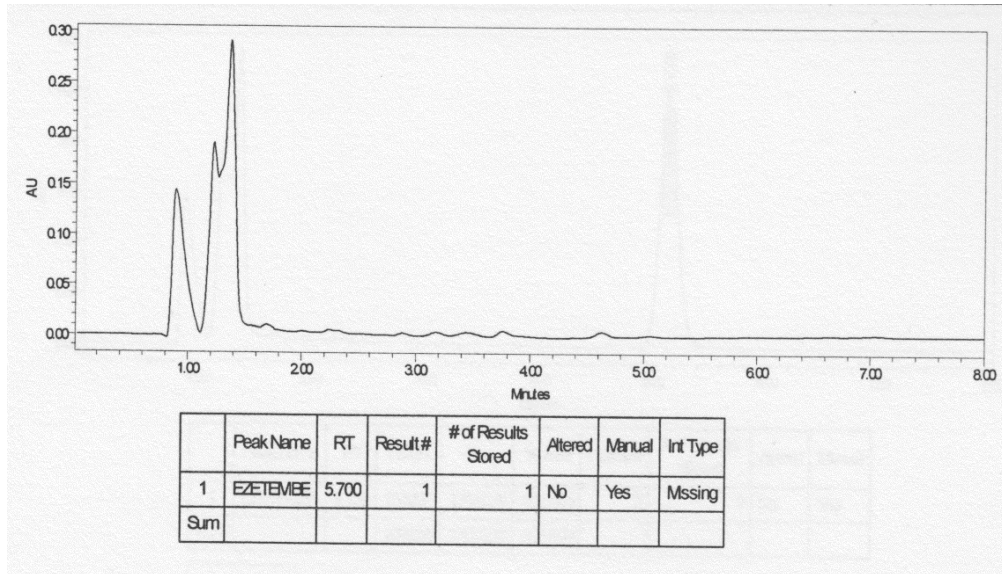


Şekil 4.13. FaSSIF ortamındaki in vitro çözünme hızı örneğinin kromatogramı

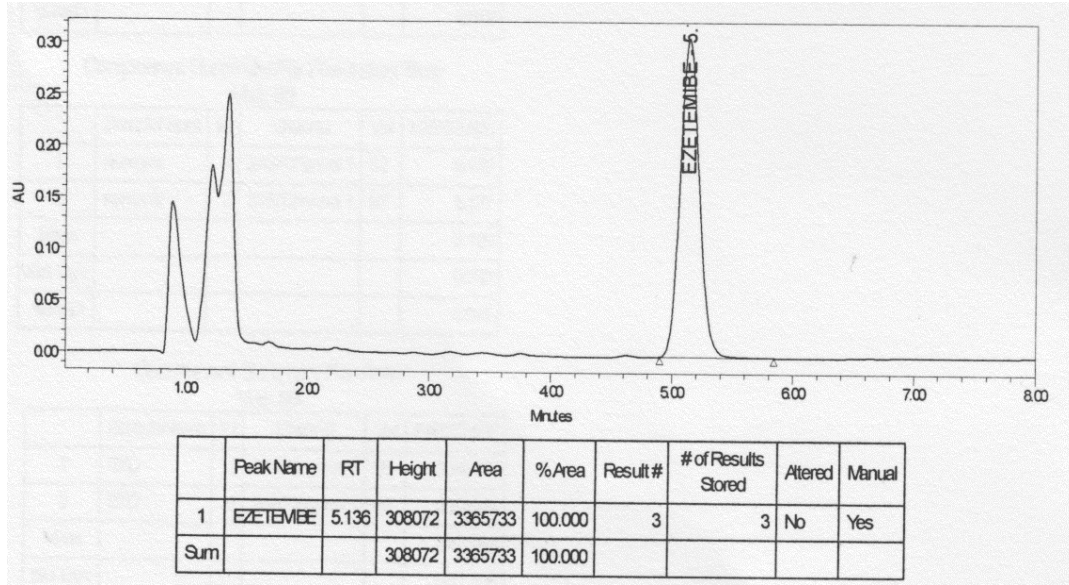
FeSSIF ortamında yapılan çalışmalar



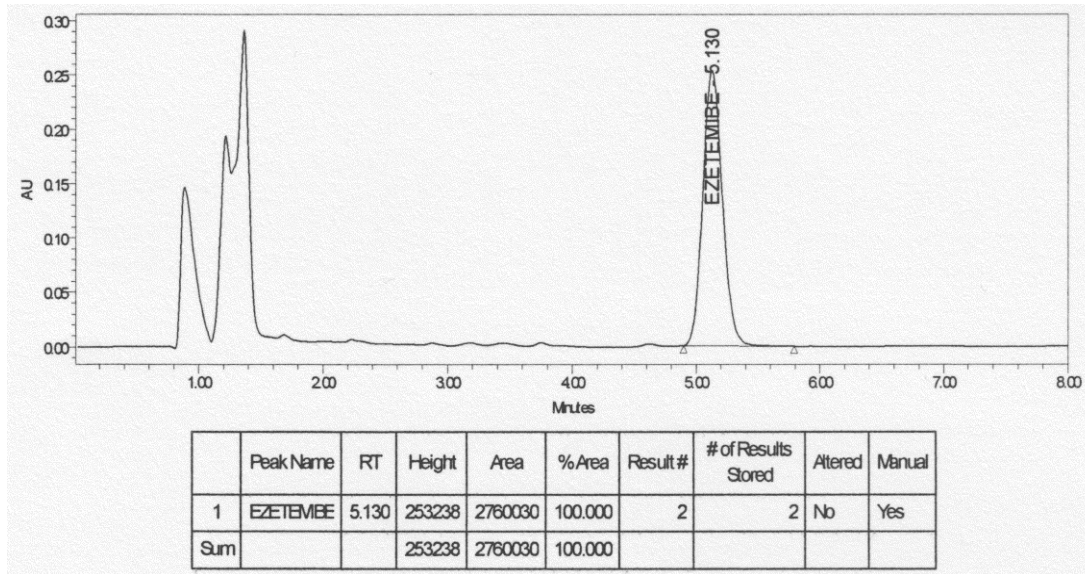
Şekil 4.14. FeSSIF ortamının kromatogramı



Şekil 4.15. FeSSIF ortamındaki plasebo çözeltisinin kromatogramı



Şekil 4.16. FeSSIF ortamdaki standart çözeltisinin kromatogramı



Şekil 4.17. FeSSIF ortamdaki çözünme hızı örneğinin kromatogramı

4.6. Kesinlik

FaSSIF ve FeSSIF ortamları için kesinlik parametresi sonuçları aşağıda verilmiştir Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7’de sunulmaktadır.

Çizelge 4.6. FaSSIF ortamdaki kesinlik sonuçları

	FaSSIF (20. dakika)		FaSSIF (20. dakika-tek beher)	
	Alan	Çözünen	Alan	Çözünen
	[AU, dk]	[%]	[AU, dk]	[%]
	1357979	40,7	1341757	40,2
	1559068	46,7	1370782	41,1
	1367763	41,0	139767	41,7
	1404190	42,1	1398268	41,9
	1364931	40,9	1416426	42,4
	1446685	43,3	1426057	42,8
X_{ort}	1416769,33	42,4	1182176,2	41,7
SS	77262,2	2,3	511605,6	0,9
%VK	5,4	5,4	43,3	2,3

* AU: absorbans birimi

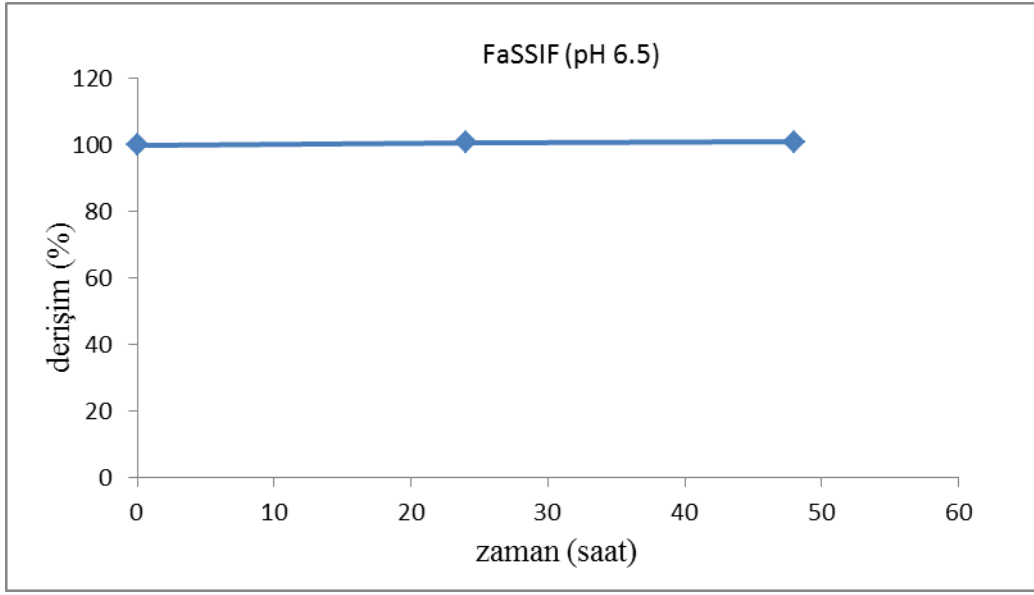
Çizelge 4.7. FeSSIF ortamdaki kesinlik sonuçları

	FeSSIF (20. dakika)		FeSSIF (20. dakika-tek beher)	
	Alan	Çözünen	Alan	Çözünen
	[AU, dk]	[%]	[AU, dk]	[%]
	2745791	81,6	2901181	86,2
	2776026	82,5	2912730	86,6
	2694302	80,1	2925094	86,9
	2798652	83,2	2930785	87,1
	2908341	86,4	2925197	86,9
	2847457	84,6	2932498	87,1
X_{ort}	2795094,8	83,1	2921247,5	86,8
SS	75541,8	2,2	12026,17	0,4
%VK	2,7	2,7	0,4	0,4

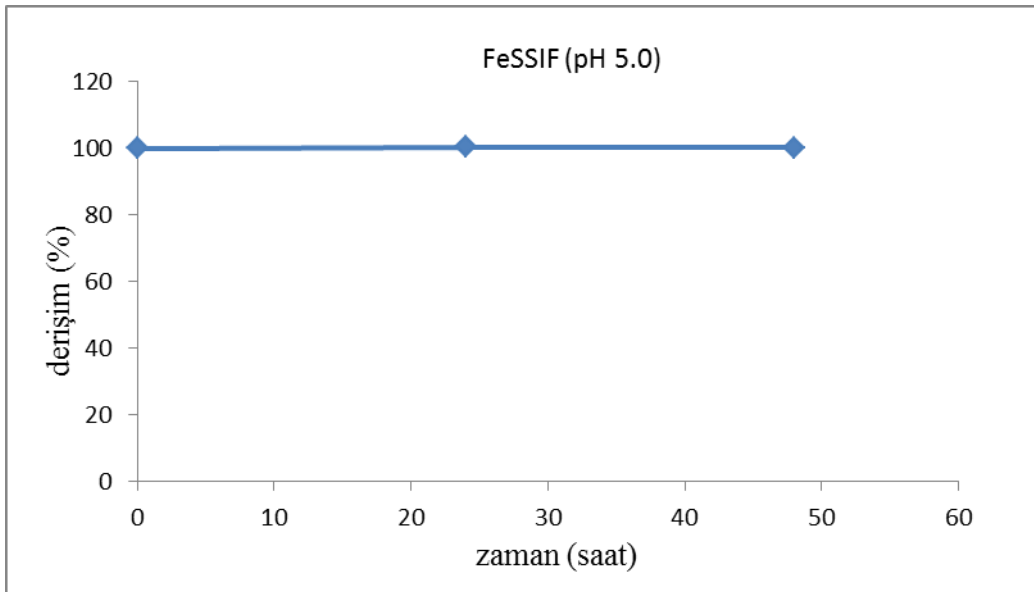
* AU: absorbans birimi

4.7. Stabilite

Ezetimibin FaSSIF ve FeSSIF ortamlarındaki stabilitesinin incelenmesi amacıyla oda sıcaklığında (25°C) stabilite deneyleri yapıldı ve derişim yüzdesinde bir değişim olup olmadığı izlendi. 24. ve 48. saatlerde örnekleme yapılarak zamana karşı derişim grafikleri çizilmiştir. Şekil 4.18 ve Şekil 4.19’da FaSSIF ve FeSSIF ortamlarındaki etkin madde stabilitesine ait grafikler görölmektedir.



Şekil 4.18. Ezetimibin 25°C’de FaSSIF ortamındaki stabilitesi



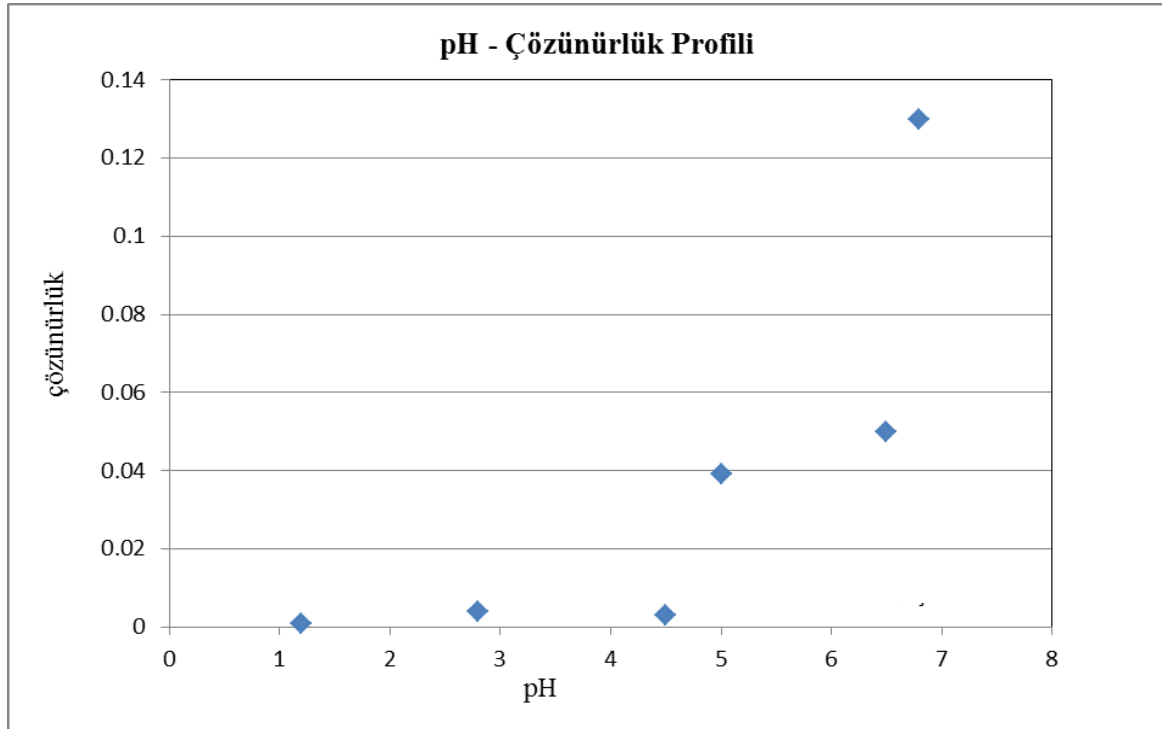
Şekil 4.19. Ezetimibin 25°C’de FeSSIF ortamındaki stabilitesi

4.8. Çözünürlük

37°C’de shake-flask metoduyla gerçekleştirilen çözünme hızı çalışmasının sonuçları Çizelge 4.8 ve Şekil 4.20’de sunulmaktadır.

Çizelge 4.8. Ezetimib çözünürlük çalışması sonuçları

Çözünme Ortamı	Çözünürlük (mg/mL)
pH 1,2 + %0,45 SLS	0,001
2,8 + %0,45 SLS	0,004
pH 4,5 + %0,45 SLS	0,003
FeSSIF (pH 5,0)	0,039
FaSSIF (pH 6,5)	0,050
pH 6,8 + %0,45 SLS	0,130



Şekil 4.20. Ezetimibin pH-çözünürlük profili grafik içinde çözünürlük

4.9. In vitro çözünme hızı çalışmaları

İn vitro çözünme hızı testleri 3.2.11’de anlatıldığı şekilde, Zentiva Sağlık Ürünleri’ne ait Ezetimib 10 mg Tablet (Lot no: Pilot 02) ve MSD’ye ait Ezetrol 10 mg Tablet (Belçika, Lot no: 301635) ürünleri için, pH 2,8+SLS, pH 4,5+SLS, pH6,8+SLS, FaSSIF ve FeSSIF ortamlarında 12’şer tabletle gerçekleştirilmiştir.

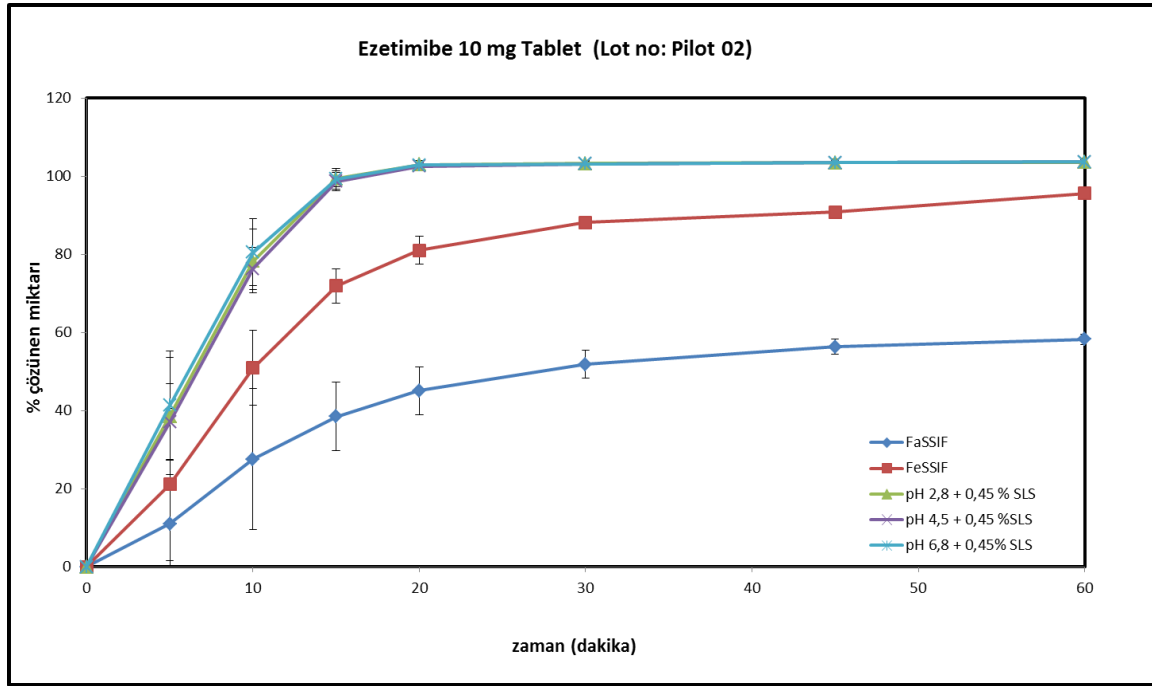
Ortalama çözünme hızı sonuçları, Çizelge 4.9’da, çözünme hızı profilleri Şekil 4.21-Şekil 4.22’de gösterilmektedir. Detaylı çözünme hızı sonuçları ise Çizelge 4.10-Çizelge 4.19’da sunulmaktadır.

Klasik in vitro çözünme ortamlarındada % çözünen miktarları her iki ürün için de 15 dakikada %85’i geçtiği için f_2 hesaplaması yapılmamıştır.

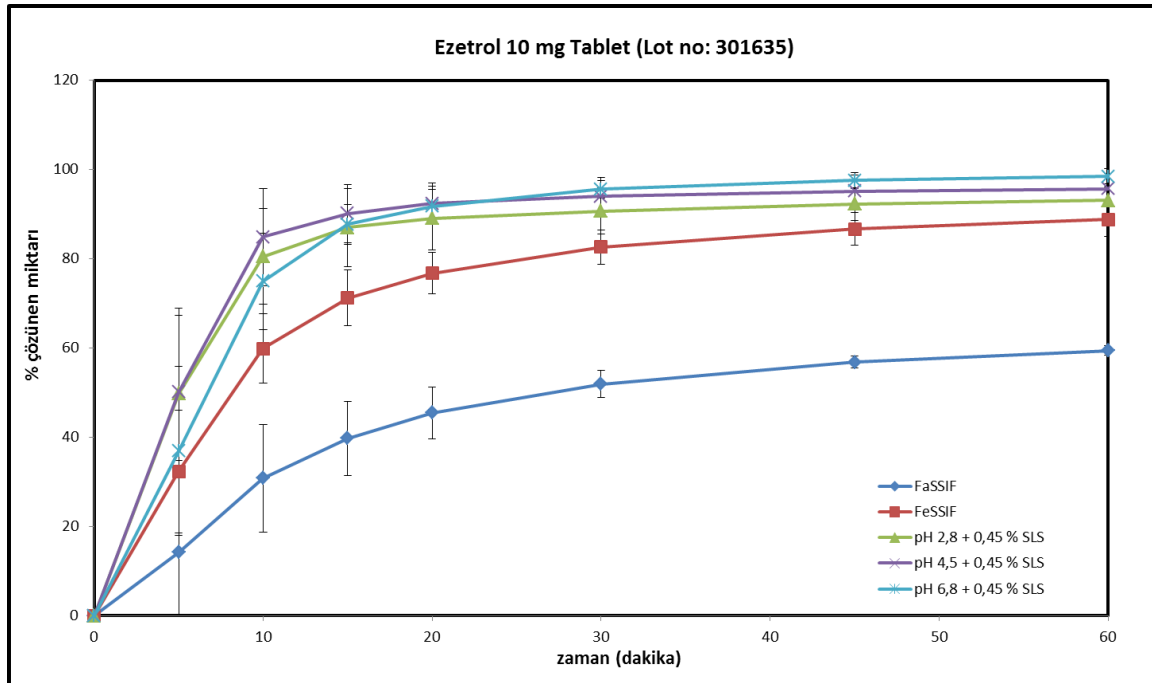
FaSSIF ve FeSSIF ortamlarında ise f_2 değerleri sırasıyla 87 ve 57’dir. Bu ortamlardaki karşılaştırmalı in vitro çözünme hızı profilleri Şekil 4.23’te gösterilmektedir.

Çizelge 4.9. İn vitro çözünme hızı sonuçları

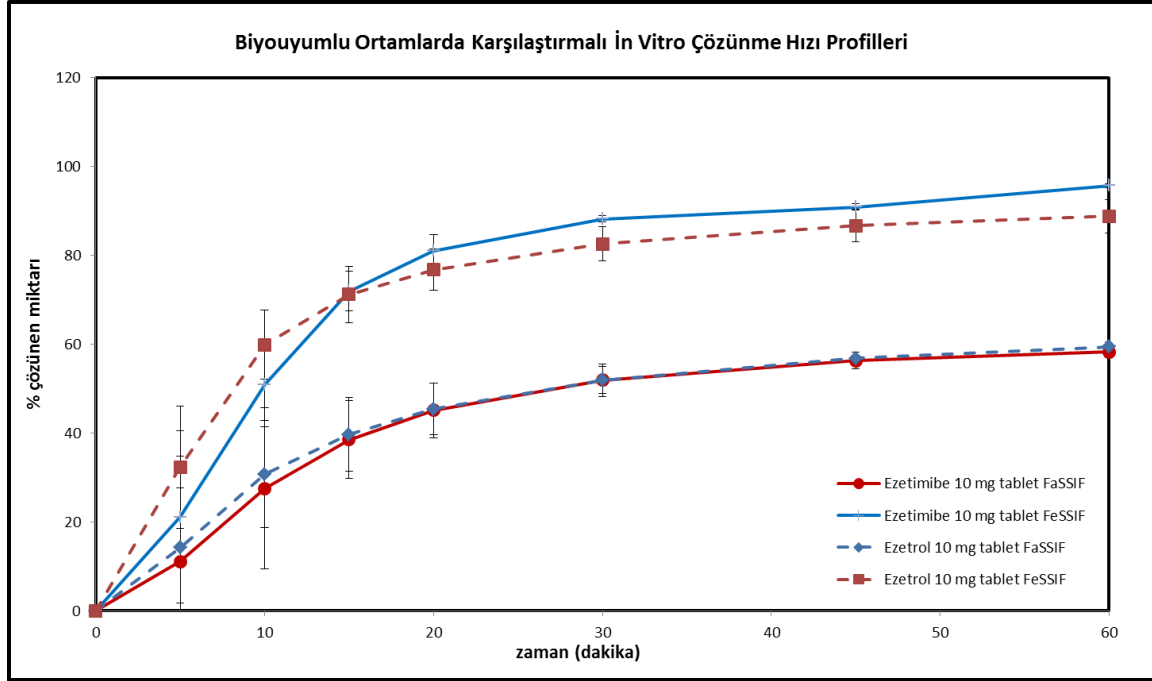
	Ürünler		Zaman (dakika)						
			5	10	15	20	30	45	60
pH 2,8 + % 0,45 SLS	Ezetimibe 10 mg Tablet	X _{ort}	38,6	78,3	99,4	103,0	103,3	103,5	103,6
		%VK	15,0	8,1	2,7	1,0	0,6	0,5	0,7
	Ezetrol 10 mg Tablet	X _{ort}	49,8	80,5	87,0	89,1	90,7	92,3	93,1
		%VK	17,5	10,7	8,7	7,1	5,2	3,7	2,9
pH 4,5 + % 0,45 SLS	Ezetimibe 10 mg Tablet	X _{ort}	37,1	76,3	98,7	102,6	103,2	103,5	103,7
		%VK	9,8	5,4	2,4	0,9	0,7	0,8	0,8
	Ezetrol 10 mg Tablet	X _{ort}	50,1	84,8	90,1	92,3	94,0	95,1	95,7
		%VK	11,7	4,9	3,9	3,4	2,4	2,4	2,6
pH 6,8 + % 0,45 SLS	Ezetimibe 10 mg Tablet	X _{ort}	41,3	80,5	99,3	102,8	103,2	103,5	103,7
		%VK	14,0	8,6	2,1	0,8	0,8	0,9	1,0
	Ezetrol 10 mg Tablet	X _{ort}	36,9	74,9	87,7	91,8	95,6	97,5	98,4
		%VK	14,3	9,6	7,4	5,8	4,8	4,6	4,3
FaSSIF	Ezetimibe 10 mg Tablet	X _{ort}	11,1	27,5	38,5	45,1	51,9	56,3	58,2
		%VK	16,5	18,1	8,7	6,2	3,6	1,9	1,3
	Ezetrol 10 mg Tablet	X _{ort}	14,2	30,8	39,7	45,4	51,9	56,8	59,4
		%VK	20,6	12,0	8,2	5,8	3,1	1,3	1,2
FeSSIF	Ezetimibe 10 mg Tablet	X _{ort}	21,1	50,9	71,9	81,0	88,2	90,9	95,7
		%VK	19,4	9,6	4,4	3,5	0,8	0,7	0,5
	Ezetrol 10 mg Tablet	X _{ort}	32,3	59,8	71,2	76,7	82,6	86,7	88,8
		%VK	13,7	7,8	6,3	4,6	3,8	3,7	3,8



Şekil 4.21. Ezetimib 10 mg tablet in vitro çözünme hızı profilleri



Şekil 4.22. Ezetrol 10 mg tablet in vitro çözünme hızı profilleri



Şekil 4.23. Biyoyumlu ortamlarda karşılaştırmalı in vitro çözünme hızı profilleri

4.9.1. Ezetimib 10 mg Tablet (Pilot 02) için Klasik İn Vitro Çözünme Ortamlarında Gerçekleştirilen Çalışmalar

Çizelge 4.10. pH 2,8 + %0,45 ortamındaki in vitro çözünme hızı sonuçları (n=12)

Ezetimib 10 mg Tablet, Lot No: Pilot 02, Zentiva TR, Çözünme ortamı: pH 2,8+0,45%SLS, 500 mL, 50 rpm															
zaman (dakika)	1.tablet	2.tablet	3.tablet	4.tablet	5.tablet	6.tablet	7.tablet	8.tablet	9.tablet	10.tablet	11.tablet	12.tablet	X _{ort}	SS	%VK
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	29	30	43	43	49	38	34	41	38	36	39	43	38,6	5,8	15,0
10	68	67	80	83	87	80	73	79	80	76	81	86	78,3	6,3	8,1
15	95	95	102	101	102	99	96	99	101	100	101	102	99,4	2,7	2,7
20	102	102	103	104	103	104	101	102	103	104	104	104	103,0	1,0	1,0
30	103	102	103	104	103	104	103	103	103	104	104	104	103,3	0,7	0,6
45	104	103	103	104	103	104	103	103	103	104	104	104	103,5	0,5	0,5
60	104	103	103	104	104	104	103	103	103	105	104	104	103,6	0,7	0,7

Çizelge 4.11. pH 4,5 + %0,45 ortamındaki in vitro çözünme hızı sonuçları (n=12)

Ezetimib 10 mg Tablet, Lot No: Pilot 02, Zentiva TR, Çözünme ortamı: pH 4,5+0,45%SLS, 500 mL, 50 rpm															
zaman (dakika)	1.tablet	2.tablet	3.tablet	4.tablet	5.tablet	6.tablet	7.tablet	8.tablet	9.tablet	10.tablet	11.tablet	12.tablet	X _{ort}	SS	%VK
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	34	34	40	36	33	37	34	40	37	34	42	44	37,1	3,6	9,8
10	73	69	78	75	74	78	75	81	77	72	81	83	76,3	4,1	5,4
15	98	94	97	98	98	100	99	101	96	99	102	102	98,7	2,4	2,4
20	102	101	101	103	103	102	104	103	103	103	103	103	102,6	0,9	0,9
30	102	104	103	103	103	102	104	104	103	103	104	103	103,2	0,7	0,7
45	103	104	103	103	103	102	105	104	104	104	104	103	103,5	0,8	0,8
60	103	104	103	104	104	102	105	104	104	104	104	103	103,7	0,8	0,8

Çizelge 4.12. pH 6,8 + %0,45 ortamındaki in vitro çözünme hızı sonuçları (n=12)

Ezetimib 10 mg Tablet, Lot No: Pilot 02, Zentiva TR, Çözünme ortamı: pH 6,8+0,45%SLS, 500 mL, 50 rpm															
zaman (dakika)	1.tablet	2.tablet	3.tablet	4.tablet	5.tablet	6.tablet	7.tablet	8.tablet	9.tablet	10.tablet	11.tablet	12.tablet	X _{ort}	SS	%VK
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	35	35	37	36	42	47	51	50	43	44	40	36	41,3	5,8	14,0
10	73	71	75	75	82	88	90	91	84	84	77	76	80,5	6,9	8,6
15	97	96	101	98	99	101	101	103	100	100	97	99	99,3	2,1	2,1
20	103	102	103	103	102	102	102	104	104	104	103	102	102,8	0,8	0,8
30	104	103	104	103	102	102	102	104	104	104	103	103	103,2	0,8	0,8
45	104	104	104	103	102	102	103	104	104	105	104	103	103,5	0,9	0,9
60	104	104	104	104	102	102	103	104	105	105	104	103	103,7	1,0	1,0

4.9.2. Ezetimib 10 mg Tablet (Pilot 02) için Biyouyumlu Ortamlarda Gerçekleştirilen Çalışmalar

Çizelge 4.13. FaSSIF ortamındaki in vitro çözünme hızı sonuçları (n=12)

Ezetimib 10 mg Tablet, Lot No: Pilot 02, Zentiva TR, Çözünme ortamı: FaSSIF, 500 mL, 50 rpm															
zaman (dakika)	1.tablet	2.tablet	3.tablet	4.tablet	5.tablet	6.tablet	7.tablet	8.tablet	9.tablet	10.tablet	11.tablet	12.tablet	X _{ort}	SS	%VK
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	7,7	12,5	10,5	11,3	11,1	11,4	8,2	11,1	12,0	11,9	14,2	30,9	11,1	1,8	16,5
10	21,3	28,8	24,9	25,1	25,9	28,5	22,4	27,6	28,1	26,5	30,5	41,0	27,5	5,0	18,1
15	33,2	40,0	37,0	36,7	37,2	39,0	35,1	39,6	39,2	38,0	40,7	46,7	38,5	3,3	8,7
20	40,6	46,0	43,8	43,6	43,8	45,5	42,7	46,0	45,9	44,9	46,8	52,0	45,1	2,8	6,2
30	49,3	51,9	50,5	50,6	50,8	52,4	50,6	52,1	52,7	52,0	52,9	56,8	51,9	1,9	3,6
45	54,7	56,3	55,3	55,1	55,7	56,9	55,6	56,8	57,2	56,6	57,2	58,5	56,3	1,1	1,9
60	57,2	58,4	57,7	57,2	57,7	58,5	57,7	59,0	59,1	58,9	59,3	*	58,2	0,8	1,3

*enjeksiyon hatası

Çizelge 4.14. FeSSIF ortamındaki in vitro çözünme hızı sonuçları (n=12)

Ezetimibe 10 mg Tablet, Lot No: Pilot 02, Zentiva TR, Çözünme ortamı: FeSSIF, 500 mL, 50 rpm															
zaman (dakika)	1.tablet	2.tablet	3.tablet	4.tablet	5.tablet	6.tablet	7.tablet	8.tablet	9.tablet	10.tablet	11.tablet	12.tablet	X _{ort}	SS	%VK
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	24,9	20,5	26,4	22,7	23,3	29,1	16,5	17,0	17,8	18,3	18,9	18,1	21,1	4,1	19,4
10	58,1	47,8	55,5	54,1	51,3	59,7	43,7	46,4	48,3	49,0	49,4	48,1	50,9	4,9	9,6
15	76,5	68,2	74,6	73,8	70,9	77,2	66,7	69,2	72,2	70,8	72,0	71,0	71,9	3,2	4,4
20	84,0	79,0	83,4	82,7	80,5	83,9	73,4	80,0	81,9	81,4	81,6	80,8	81,0	2,9	3,5
30	88,7	87,1	88,8	89,6	87,5	88,7	88,1	88,3	88,5	87,7	88,0	87,5	88,2	0,7	0,8
45	92,1	90,8	91,5	91,6	90,7	90,9	90,9	90,8	90,8	89,8	90,7	89,8	90,9	0,7	0,7
60	95,8	95,1	96,1	95,9	95,0	95,5	96,1	95,8	96,3	95,0	96,0	95,4	95,7	0,5	0,5

4.9.3. Ezetrol 10 mg Tablet (Lot no: 301635) için Klasik İn Vitro Çözünme Ortamlarında Gerçekleştirilen Çalışmalar

Çizelge 4.15. pH 2,8 + %0,45 ortamındaki in vitro çözünme hızı sonuçları (n=12)

Ezetrol 10 mg Tablet, Lot No: 301635, Belçika, Çözünme ortamı: pH 2,8+0,45%SLS, 500 ml, 50 rpm															
zaman (dakika)	1.tablet	2.tablet	3.tablet	4.tablet	5.tablet	6.tablet	7.tablet	8.tablet	9.tablet	10.tablet	11.tablet	12.tablet	X _{ort}	SS	%VK
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	45	58	52	55	50	56	28	48	56	40	52	57	49,8	8,7	17,5
10	79	88	82	79	85	86	56	84	79	76	88	84	80,5	8,6	10,7
15	86	92	91	85	89	91	65	89	88	83	94	91	87,0	7,6	8,7
20	88	92	92	87	90	92	71	92	90	86	95	94	89,1	6,3	7,1
30	89	93	93	88	92	93	78	93	91	88	96	94	90,7	4,7	5,2
45	91	94	94	89	93	94	84	94	92	90	97	95	92,3	3,4	3,7
60	92	94	95	90	93	95	87	95	93	91	97	95	93,1	2,7	2,9

Çizelge 4.16. pH 4,5 + %0,45 ortamındaki in vitro çözünme hızı sonuçları (n=12)

Ezetrol 10 mg Tablet, Lot No: 301635, Belçika, Çözünme ortamı: pH 4,5 +0,45%SLS, 500 ml, 50 rpm															
zaman (dakika)	1.tablet	2.tablet	3.tablet	4.tablet	5.tablet	6.tablet	7.tablet	8.tablet	9.tablet	10.tablet	11.tablet	12.tablet	X _{ort}	SS	%VK
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	52	50	52	48	44	41	44	55	47	49	59	60	50,1	5,9	11,7
10	82	86	91	84	81	75	88	84	86	89	86	86	84,8	4,2	4,9
15	87	89	95	89	89	82	93	89	94	93	91	90	90,1	3,5	3,9
20	89	90	96	93	92	86	94	90	96	94	96	92	92,3	3,1	3,4
30	92	92	97	95	95	90	95	92	97	94	96	93	94,0	2,2	2,4
45	93	93	97	97	98	92	95	92	98	95	97	94	95,1	2,3	2,4
60	94	93	98	98	99	92	96	93	98	95	98	94	95,7	2,5	2,6

Çizelge 4.17. pH 6,8 + %0,45 ortamındaki in vitro çözünme hızı sonuçları (n=12)

Ezetrol 10 mg Tablet, Lot No: 301635, Belçika, Çözünme ortamı: pH 6,8 +0,45%SLS, 500 ml, 50 rpm															
zaman (dakika)	1.tablet	2.tablet	3.tablet	4.tablet	5.tablet	6.tablet	7.tablet	8.tablet	9.tablet	10.tablet	11.tablet	12.tablet	X _{ort}	SS	%VK
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	32	31	30	43	36	43	38	35	31	45	38	41	36,9	5,3	14,3
10	70	68	74	70	69	80	81	74	64	88	77	84	74,9	7,2	9,6
15	85	79	93	83	85	90	91	84	77	98	93	94	87,7	6,5	7,4
20	91	86	96	92	94	96	92	86	80	98	94	96	91,8	5,3	5,8
30	98	94	98	98	101	99	94	89	85	99	96	96	95,6	4,6	4,8
45	100	99	99	100	102	101	95	91	87	100	97	99	97,5	4,4	4,6
60	102	100	100	100	103	101	96	92	89	101	97	100	98,4	4,2	4,3

4.9.4. Ezetrol 10 mg Tablet için Biyouyumlu Ortamlarda Gerçekleştirilen Çalışmalar

Çizelge 4.18. FaSSIF ortamındaki in vitro çözünme hızı sonuçları (n=12)

Ezetrol 10 mg Tablet, Lot No: 301635, Belçika, Çözünme ortamı: FaSSIF, 500 ml, 50 rpm															
zaman (dakika)	1.tablet	2.tablet	3.tablet	4.tablet	5.tablet	6.tablet	7.tablet	8.tablet	9.tablet	10.tablet	11.tablet	12.tablet	X _{ort}	SS	%VK
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	16,1	17,9	15,0	16,7	13,4	16,6	9,9	10,7	11,9	16,1	16,2	9,7	14,2	2,9	20,6
10	35,2	35,5	31,6	33,0	30,2	33,4	26,9	28,1	26,1	33,8	31,0	24,2	30,8	3,7	12,0
15	43,3	43,4	40,1	41,5	40,8	42,0	37,1	37,4	34,7	42,4	40,1	33,6	39,7	3,3	8,2
20	48,2	48,2	45,5	46,4	46,2	47,3	43,1	44,1	41,5	48,1	46,0	40,4	45,4	2,6	5,8
30	53,5	53,6	52,0	52,5	51,3	53,1	50,9	51,8	49,4	53,5	52,4	48,8	51,9	1,6	3,1
45	57,7	57,6	56,2	56,8	56,2	57,1	56,5	57,4	55,5	57,3	57,7	55,8	56,8	0,8	1,3
60	59,6	59,5	58,9	58,5	58,5	60,2	59,0	60,2	59,0	60,0	60,6	59,2	59,4	0,7	1,2

Çizelge 4.19. FeSSIF ortamındaki in vitro çözünme hızı sonuçları (n=12)

Ezetrol 10 mg Tablet, Lot No: 301635, Belçika, Çözünme ortamı: FeSSIF, 500 ml, 50 rpm															
zaman (dakika)	1.tablet	2.tablet	3.tablet	4.tablet	5.tablet	6.tablet	7.tablet	8.tablet	9.tablet	10.tablet	11.tablet	12.tablet	X _{ort}	SS	%VK
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	26,8	34,9	38,2	33,6	31,5	39,4	29,2	33,0	26,1	26,4	34,1	34,3	32,3	4,4	13,7
10	55,8	59,2	62,7	60,9	61,7	62,4	64,4	55,8	50,8	54,7	63,2	66,6	59,8	4,6	7,8
15	66,6	69,6	72,1	73,2	72,4	72,4	76,1	66,7	63,7	67,3	76,2	78,3	71,2	4,5	6,3
20	72,6	75,2	76,9	78,7	77,6	75,9	81,2	72,4	72,7	73,8	81,0	82,4	76,7	3,6	4,6
30	78,8	80,6	81,9	84,3	81,9	80,8	88,3	79,1	83,3	79,5	85,8	86,6	82,6	3,1	3,8
45	83,4	84,2	85,1	87,9	85,1	84,0	92,4	83,9	90,2	84,1	89,9	90,0	86,7	3,2	3,7
60	85,6	86,2	87,4	89,9	86,9	85,7	94,9	86,2	93,3	86,0	91,4	91,9	88,8	3,3	3,8

4.10. GastroPlus™'la Yapılan Simülasyon Çalışmaları

4.10.1. Molekül özellikleri sekmesi

Ezetimibin molekül formülü $C_{24}H_{21}F_2NO_3$ 'tür. Bu sekmede Çizelge 4.20'de verilen molekül özellikleri girilmiştir. Molekül özelliklerine göre programda otomatik olarak hesaplanan doz, emilme ve çözünme sayıları sırasıyla, 0,4238; 7,711 ve 7,289'dur. Doz sayısının 1'den küçük olması, verilen ilaç dozunun vücutta çözünebileceğini, emilme ve çözünme sayılarının 1'den büyük olması da ilacın mide bağırsak kanalında kalış süresinin çözünme ve emilim için yeterli olacağını gösterir.

Çizelge 4.20. Ezetimib için GastroPlus™ programında kullanılan veriler

Parametre	Değer
Molekül ağırlığı*	409,44
Log P**	4,31
P_{eff} (insan için)**	$3,88 \text{ cm/sn} \times 10^4$
Doz*	10 mg
Doz hacmi*	250 mL
Çözünürlük**	0,0945 (pH 6,53)
Ortalama çöküş zamanı***	900 sn
Difüzyon katsayısı****	$0,65 \text{ cm}^2/\text{s} \times 10^5$
Partikül yoğunluğu***	1,2 g/mL
Partikül boyutu***	$r=10 \mu\text{m}$, $d=20 \mu\text{m}$

*Manuel olarak girilmiştir.

**ADMET Predictor™'la hesaplanmıştır.

***GastroPlus™'taki varsayılan değerdir.

****GastroPlus™ tarafından hesaplanmıştır.

Çizelge 4.20'da sunulan veriler, GastroPlus™'ın Resim 4.1'de gösterilen molekül özellikleri sekmesine girilmiştir.

GastroPlus(TM): Ezetimibe-final.mdb (C:\Users\CBayka\Des..\SLP..\Cig..)

File Edit Database Simulation Setup Controlled Release Tools Modules (Optional) Help

Compound Gut Physiology-Hum Pharmacokinetics Simulation Graph

Selected Compound

Hum 10 mg IR Tab Ezetrol

Current= 6; Total = 13

Oc1ccc(cc1)C2=CC(=C(C=C2)N3C(=O)C(C3)c4ccc(F)cc4)C5=CC(=C(C=C5)C(F)(F)F)

Molecular Formula: C₂₄H₂₁F₂N₃O₃

Molecular Weight (g/mol): 409.44

logP (neutral): 4.31 @pH: -1

pKa Table

Enzyme Table

Transporter Table

SI Trans Time (h) = 3.3 Mean Abs Time (h) = 0.428

Longest Diss. Time (h) is @ pH 4.5 = 0.453 hours

Max Abs Dose (S+) = 3.294E+3 mg Max Abs Dose (lit) = 1.122E+3 mg

Support Files

Hum 10 mg IR Tab Ezetrol.opd Hum 10 mg IR Tab Ezetrol.mdd

Dosage Form: Mixed Multiple Doses

Initial Dose (mg): 10

Subsequent Doses (mg): 0

Dosing Interval (h): 0

Dose Volume (mL): 250

pH for Reference Solubility: 6.53

Solubility (mg/mL @pH=6.53): 0.0945

Mean Precipitation Time (sec): 900

Diff. Coeff. (cm²/s x 10⁻⁵): 0.65

Drug Particle Density (g/mL): 1.2

Particle Size: R=10.00, D=20.00

Effective Permeability

Source: Human

Peff (cm/s x 10⁻⁴): 3.88

Sim Peff x 10⁻⁴ (Human): 3.88

Convert from User Data

Biorelevant Solubilities

Dose No. = 0.4238

Absorption No. = 7.711

Dissolution No. = 7.289

Fup estimated by reported Ezetimibe Fup < 10%

All properties are predictions from ADMET Predictor v6.5

Tendency Supersaturate=SupSat;

pKa Table | logD: Struct-6.1 | Diss Model: Johnson | PartSize-Sol: ON | BileSalt-Sol: ON | Diff: ON | ConstRad: ON | Precip: Time | Ppara: OFF | EHC: ON

Resim 4.1. Ezetimib için molekül özellikleri sekmesi

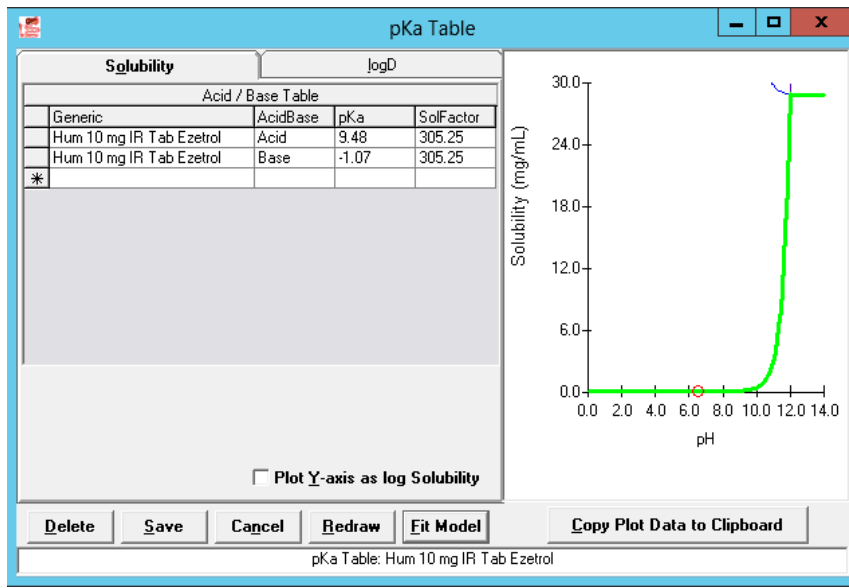
pK_a, logP, enzim ve taşıyıcı tabloları

Ezetimib fizyolojik pH'da iyonize olmaz. ADMET Predictor™'la tahmin edilen asidik ve bazik pK_a değerleri 9,48 ve -1,07'dir. Çözünürlük-pH tablosu Resim 4.2'de sunulmaktadır.

ADMET Predictor'la kullanılarak tahmin edilen LogP değeri ise 4,31'dir, pH-LogP Tablosu Resim 4.3'te sunulmaktadır.

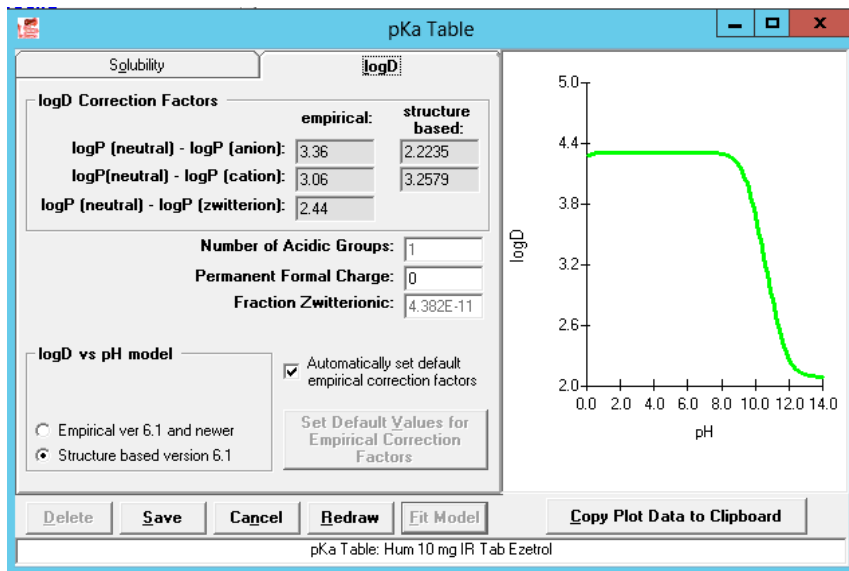
pH-çözünürlük profili

Referans çözünürlük ve pK_a değerleri ADMET Predictor™'la hesaplanmış ve pH-çözünürlük eğrisi Henderson-Hasselbach denkleminde göre uyarlanmıştır (Resim 4.2).

Resim 4.2. pK_a tablosu

pH – logD

LogP değeri ADMET Predictor™'la hesaplanmış ve molekül özellikleri ekranına girilmiştir. Program buna göre pH-logD eğrisini otomatik olarak hesaplamıştır (Resim 4.3).



Resim 4.3. pH-LogD tablosu

UGT1A1, UGT1A3 ve UGT2B7 enzimleri için Ghosal ve diğerlerinin [107] çalışmasından elde edilen K_m ve V_{max} değerleri karaciğer (PBPk) ve ince bağırsak (gut) için kullanılmıştır. Bu değerler mikrozomdan elde edilmiş değerler olduğu için programda ekstrapolasyon yapılmış ve yaklaşık in vivo değerler hesaplanmıştır. Resim 4.5'te in vitro in vivo ekstrapolasyon ekranı gösterilmektedir.

Metabolism and Transporter Units Converter: User conversion factors

Convert CLint **Convert Km and Vmax** Convert T1/2 Transporters

In vitro assay type:

- ☒ Microsomes
- ☐ Hepatocytes
- ☐ rCYP
- ☐ Cytosolic Protein

In vitro fraction unbound:

- ☒ Fu plasma
- ☐ Fu calc (Austin)
- ☐ Fu calc (Hallifax)
- ☐ User defined %
- ☐ In vitro value is unbound

in vitro Vmax nmol/min/mg protein

in vitro Km umol/L

In vivo Vmax mg/s

In vivo Km,u mg/L

Metabolite:

Show Advanced Options

Transfer 2C9 Km and Vmax values to Enzyme table

Close

Resim 4.5. In vitro in vivo ekstrapolasyon ekranı

Taşıyıcı etkisi

Yeterli veri olmadığı için ezetimib için taşıyıcı etkisi göz önüne alınmamıştır (Resim 4.6).

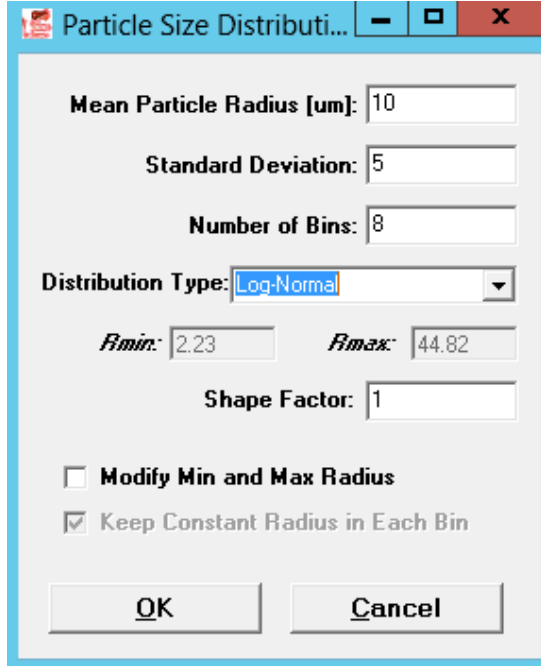
Transporter Table					
Generic	Transporter	Type	Location	Vmax (mg/s) or (mg/s/mg-trans)	Km (mg/L)
*					

Record: 0

Resim 4.6. Taşıyıcı etkisi

Partikül büyüklüğü

Partikül büyüklüğü için programda varsayılan değerler kullanılmıştır (Resim 4.7).



Particle Size Distributi...

Mean Particle Radius [um]: 10

Standard Deviation: 5

Number of Bins: 8

Distribution Type: Log-Normal

Rmin: 2.23 *Rmax*: 44.82

Shape Factor: 1

☐ Modify Min and Max Radius

☒ Keep Constant Radius in Each Bin

OK Cancel

Resim 4.7. Partikül büyüklüğü tablosu

Biyoyumlu çözünürlük sekmesi

Çözünme hızı modeli olarak Johnson modeli seçilmiştir. Hem ADMET Predictor™'la hesaplanan hem de in vitro olarak ölçülen biyoyumlu çözünürlük sonuçlarıyla simülasyon yapılmıştır. Bu değerler Resim 4.8'de gösterilen biyoyumlu çözünürlük sekmesine girilmiştir.

Dissolution Model for: Hum 10 mg IR Tab Ezetrol

Dissolution Model: **Johnson** Z-factor (mL/mg/s): **0** [Fit to In Vitro Data](#)

Effect of Temperature on Solubility

Ref Temp [degC]: **37** Melting Point [degC]: **0**

Nanoparticle Effect

☒ Adjust solubility for nanoparticle effect **Nano Factor Effect for 2.691 um particles is 1.056**

Nano Factor: **0.5** Interf tension (J/m²): **0.015**

Bile Salt Effect

☒ Adjust solubility for bile salt effect
☒ Adjust diff coeff for bile salt effect

Solubilization Ratio (SR): **219.8** [Fit to In Vitro Data](#)

☐ Use theoretical solubilization ratio

Biorelevant In Vitro Solubilities

At least one of the FaSSIF or FeSSIF solubilities must be specified to calculate solubilization ratio
 Enter 0 for values of biorelevant solubilities that are not available. Zero values are not used in SR calculation

	SGF	FaSSIF	FeSSIF
pH:	1.2	6.5	5
Bile Salt Conc (mM):	0	3	15
Solubility (mg/mL):	0.00316	0.0294	0.1

Diffusion Layer Thickness

☒ Adjust with changing radius up to maximum
☐ Use constant value

Maximum Diff Layer Thick [um]: **30**

OK **Cancel**

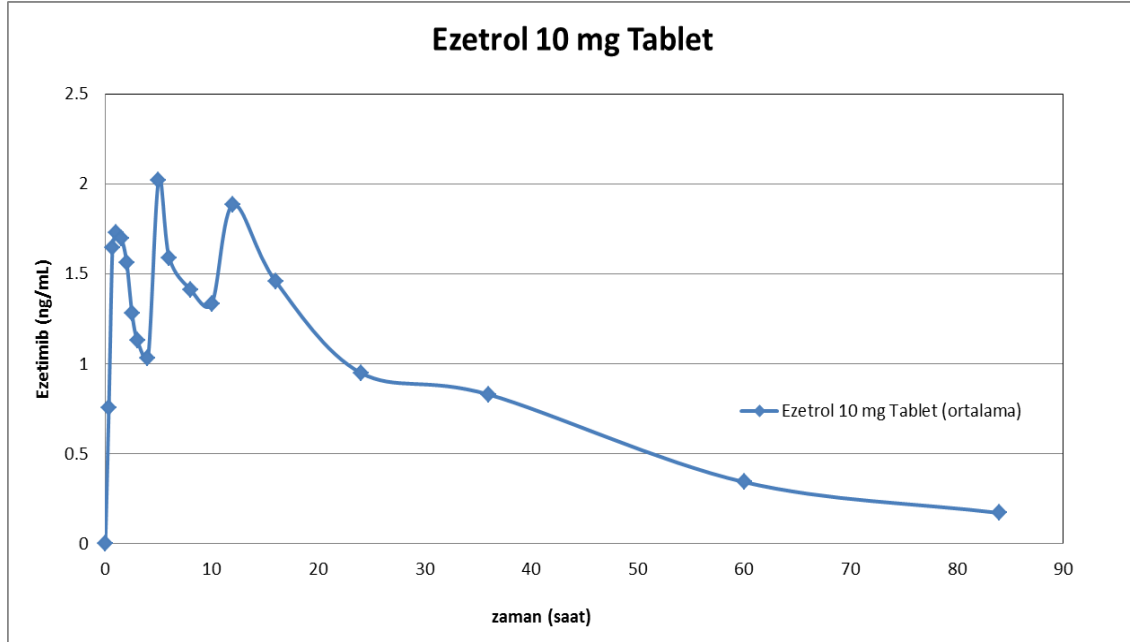
Duodenal solubility at bile salt concentration 2.8mM will be 0.095 mg/mL

Resim 4.8. Biyoyumlu çözünürlük sekmesi

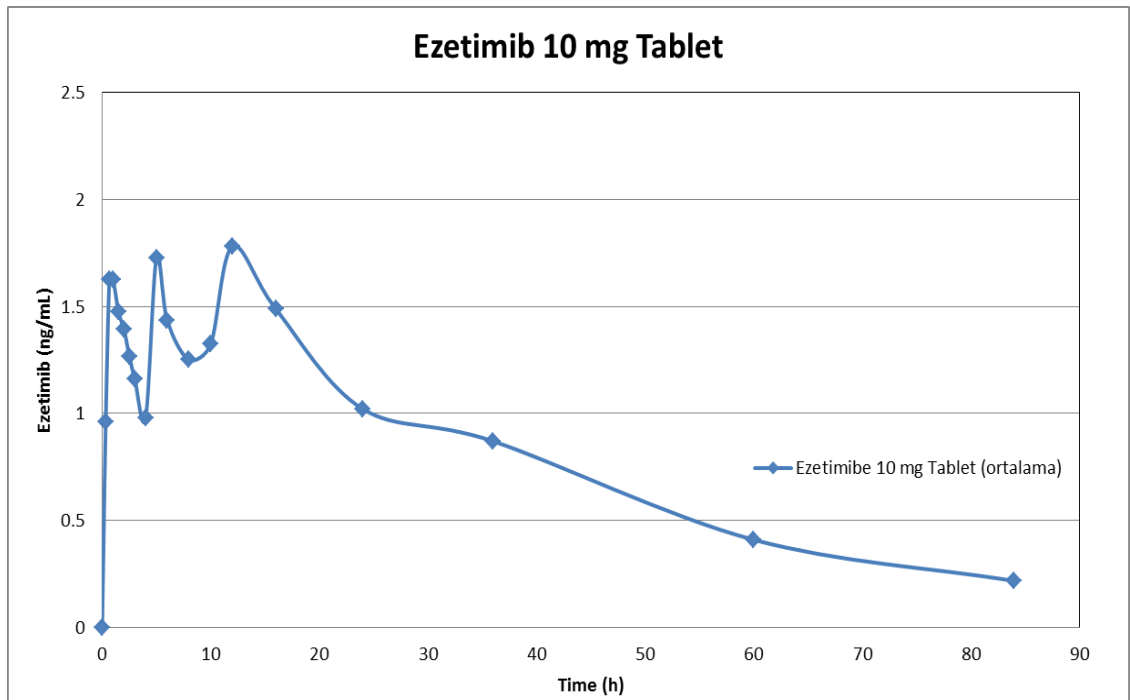
Enterohepatik sirkülasyon

Ezetimib 2.7.6'da anlatıldığı gibi, enterohepatik sirkülasyona giren bir moleküldür. Referans ürün Ezetrol 10 mg tablet ve test ürünü Ezetimib 10 mg tabletin Şekil 4.24 ve Şekil 4.25'te gösterilen plazma konsantrasyon eğrileri, 44 gönüllü üzerinde gerçekleştirilmiş biyoeşdeğerlik çalışmasından elde edilen ortalama verilerdir. Burada

plazma konsantrasyon eğrisindeki çoklu pikler açıkça görülmektedir. Bu çoklu pikler molekülün enterohepatik sikülasyonla ilişkilendirilebilir.



Şekil 4.24. Ezetrol 10 mg tablet plazma konsantrasyonu zaman eğrisi (n=44)



Şekil 4.25. Ezetimib 10 mg tablet plazma konsantrasyonu zaman eğrisi (n=44)

Yapılan çalışmalarda, ezetimib için molekül özellikleri ekranında dozaj şekli olarak IR tablet seçildiği zaman bu piklerin simüle edilemediği gözlenmiştir. Bu nedenle, pikleri simüle edebilmek için dozaj şekli olarak çoklu tekrarlı doz (mixed multiple dose) seçilmiştir. Gerçekleştirilen biyoeşdeğerlik çalışmasında, test ve referans ilaçlar açlık durumunda uygulanmış ve sonrasında 84. saate kadar kan örneği alınmıştır. Bu nedenle $t=0$ anında GastroPlus™'ta açlık durumu fizyolojisi seçilmiştir. Enterohepatik sirkülasyon, safranın ince bağırsağa boşalmasıyla meydana gelir. Safra boşalmasında da yiyecek etkisi vardır. Bu nedenle 4, 6, 10 ve 28. saatlerde de fizyoloji tokluk olarak değiştirilmiştir. Resim 4.9'da görülen çoklu tekrarlı doz tablosunda, bu saatlerde fizyolojide yapılan değişiklikler gösterilmektedir.

Tabulated Data Input

File Units Tools

Mixed Multiple Dose Information

No. of Doses: C:\Users\CBayka\Desktop\SLP_Workspace\CigdemBayka\Hum 10 mg IR Tab Ezetrol.mdd

Write comments here:

	Dosed Compound	Dosage Form	Dose [mg]	Start [h]	End [h]	Physiology or .cat file	PBPK Physiology or .pbk file
	Hum 10 mg IR Tab E	IR: Capsule	10	0	0	Human - Physiological - Fasted	
	Hum 10 mg IR Tab E	IR: Capsule	0	4	0	Human - Physiological - Fed	
	Hum 10 mg IR Tab E	IR: Capsule	0	6	0	Human - Physiological - Fasted	
	Hum 10 mg IR Tab E	IR: Capsule	0	10	0	Human - Physiological - Fed	
	Hum 10 mg IR Tab E	IR: Capsule	0	12	0	Human - Physiological - Fasted	
	Hum 10 mg IR Tab E	IR: Capsule	0	28	0	Human - Physiological - Fed	
	Hum 10 mg IR Tab E	IR: Capsule	0	30	0	Human - Physiological - Fasted	
*							

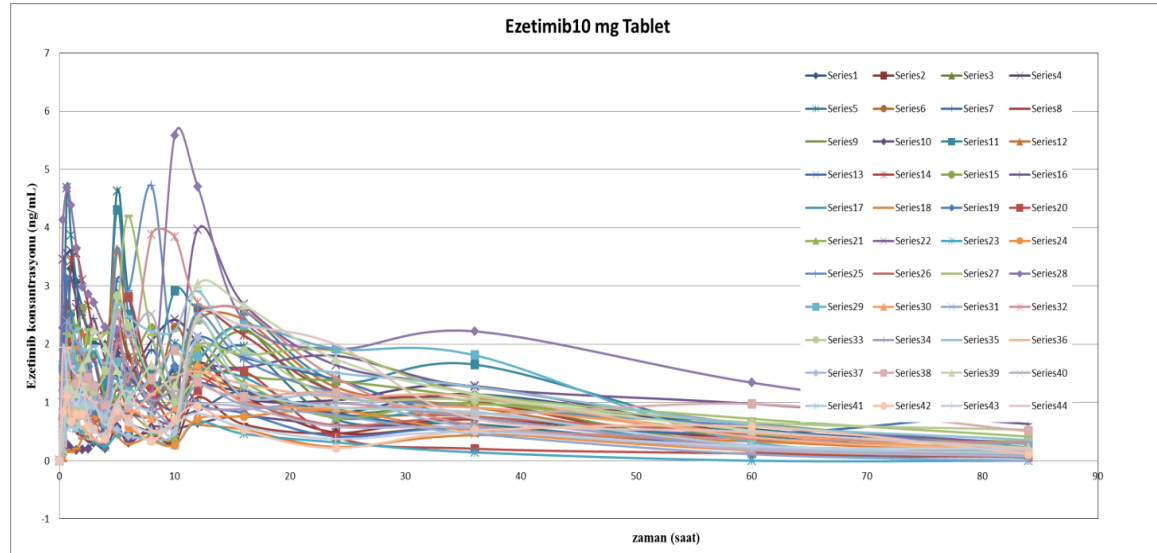
End Time is applicable only for IV:Infusion. For all other dosage forms it will be set to 0 by the program.

Delete Dose Clear Cancel OK

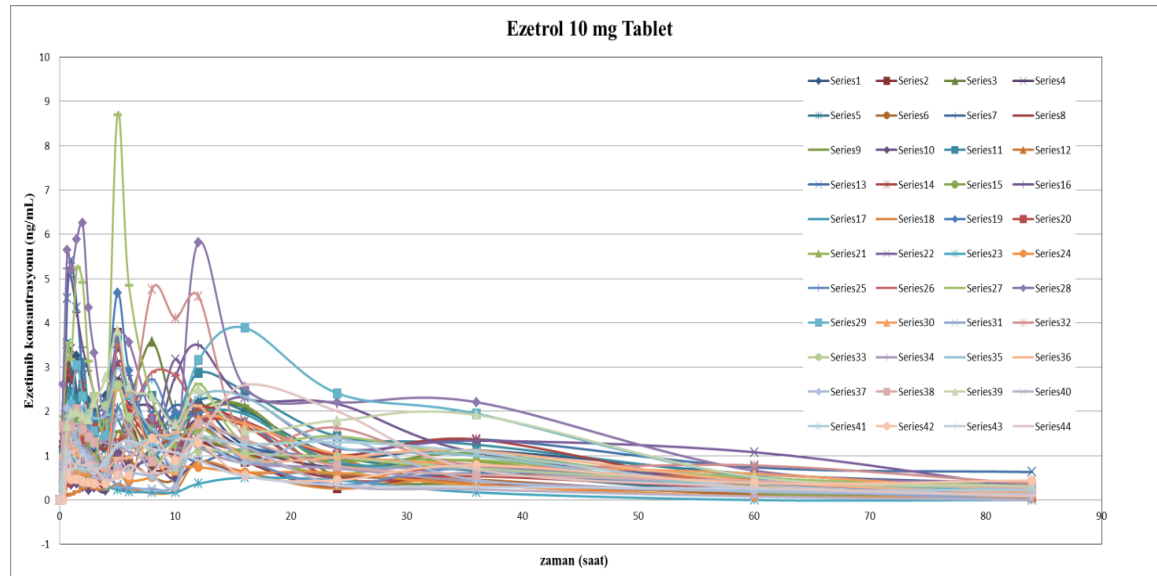
Resim 4.9. Çoklu tekrarlı doz tablosu

Bireyler arası değişkenlik

Şekil 4.26 ve Şekil 4.27’de gösterildiği gibi, ezetimib hem bireyiçi hem de bireylerarası yüksek değişkenlik gösteren bir moleküldür. Yapılan simülasyon çalışmalarında ortalama değerler kullanılmıştır.



Şekil 4.26. Ezetimib 10 mg tablet için 44 gönüllüye ait sonuçlar (n=44)



Şekil 4.27. Ezetrol 10 mg tablet için 44 gönüllüye ait sonuçlar (n=44)

4.10.2. Fizyolojik Özellikler

Fizyoloji ekranında mide bağırsak kanalının çeşitli kompartımanlarındaki P_{eff} , pH, geçiş süresi, hacim, uzunluk, çap, emilim faktörleri ve safra tuzu konsantrasyonlarında değişiklik yapılmamıştır. Ezetimib metabolizmasında etkili olan ve enzim tablosuna girilen UGT enzimleri de fizyolojik özelliklere eklenmiştir. Emilim modeli olarak, ince bağırsakın yüzey alanını da hesaba katan Opt LogD Model SAV 6.1 seçilmiştir (Resim 4.10).

Compartment Data										Enzyme and Transporter Regional Distributions			
Compartment	P _{eff}	ASF	pH	Transit Time (h)	Volume (mL)	Length (cm)	Radius (cm)	SEF	Bile Salt (mM)	UGT2... Expr	UGT2... Turn	UGT1... Expr	UGT1... Turn
Stomach	0	0.0	1.30	0.25	50.00	30.00	10.00	1.000	0.0	0.0	5.0E-4	0.0	5.0E-4
Duodenum	0	2.673	6.00	0.26	48.25	15.00	1.60	4.235	2.800	2.17E-3	5.0E-4	1.59E-3	5.0E-4
Jejunum 1	0	2.658	6.20	0.95	175.3	62.00	1.50	3.949	2.330	7.85E-3	5.0E-4	5.74E-3	5.0E-4
Jejunum 2	0	2.629	6.40	0.76	139.9	62.00	1.34	3.489	2.030	6.19E-3	5.0E-4	4.53E-3	5.0E-4
Ileum 1	0	2.592	6.60	0.59	108.5	62.00	1.18	3.029	1.410	4.73E-3	5.0E-4	3.47E-3	5.0E-4
Ileum 2	0	2.568	6.90	0.43	79.48	62.00	1.01	2.569	1.160	3.44E-3	5.0E-4	2.52E-3	5.0E-4
Ileum 3	0	2.505	7.40	0.31	56.29	62.00	0.85	2.109	0.140	2.37E-3	5.0E-4	1.74E-3	5.0E-4
Caecum	0	12.70	6.40	4.50	52.92	13.75	3.50	1.790	0.0	9.92E-3	5.0E-4	4.05E-3	5.0E-4
Asc Colon	0	24.63	6.80	13.50	56.98	29.02	2.50	2.480	0.0	0.021	5.0E-4	8.47E-3	5.0E-4

C1-C4: 0.06944 0.43028 0.12147 0.46632

Physiology: Human - Physiological - Fasted

ASF Model: Opt logD Model SAV 6.1

Qh (L/min): 1.53

Percent Fluid in SI: 40 Colon: 10

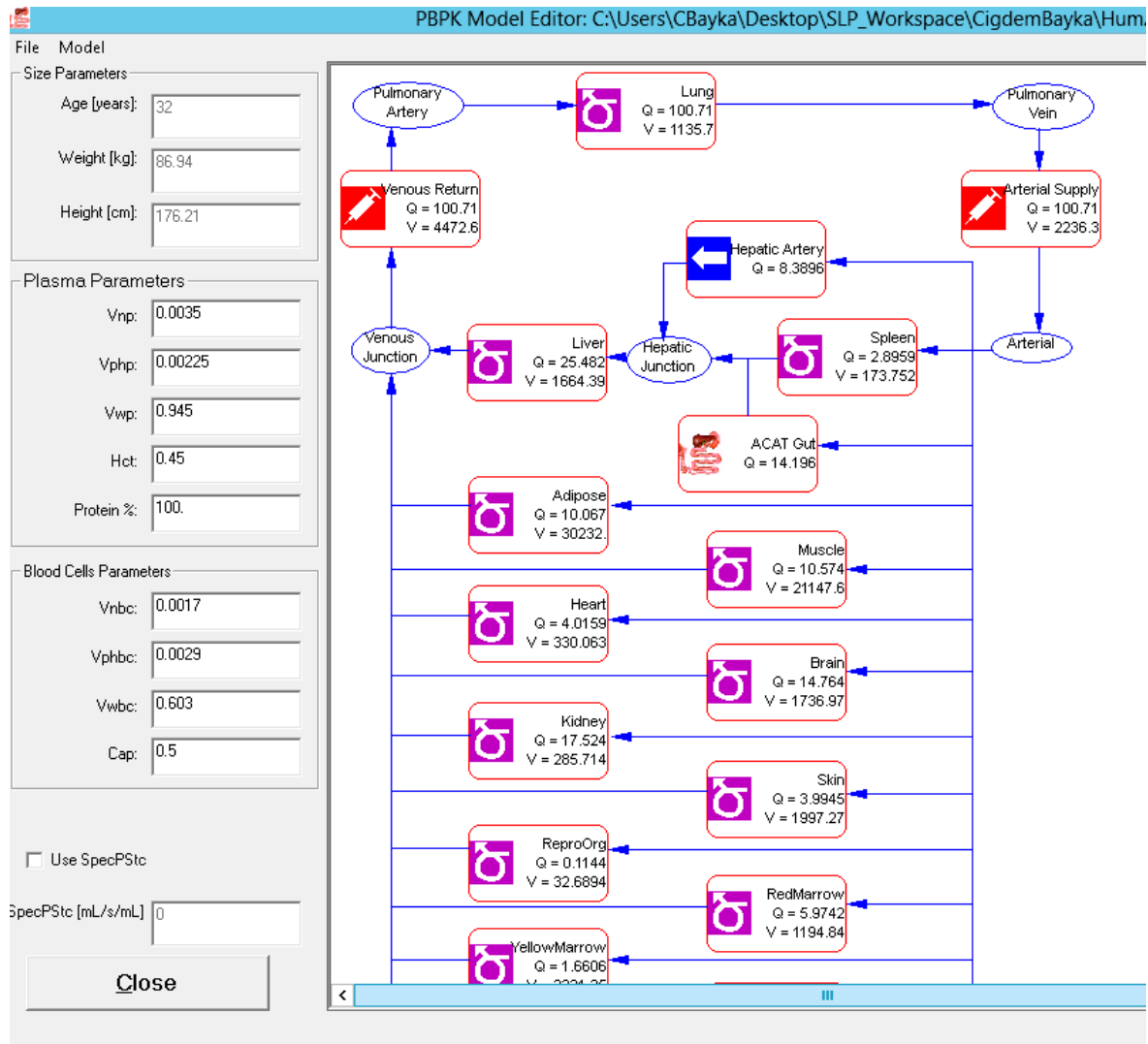
Fup estimated by reported Ezetimibe Fup < 10%
All properties are predictions from ADMET Predictor v6.5
Tendency Supersaturate=SupSat

pKa Table | logD: Struct-6.1 | Diss Model: Johnson | PartSize-Sol: ON | BileSalt-Sol: ON | IDiff: ON | ConstRad: ON | Precip: Time | Ppara: OFF | EHC: ON

Resim 4.10. Ezetimib için fizyoloji ekranı

4.10.3. Farmakokinetik Özellikler

PBPK modülünde doku ve organlar hacim, perfüzyon hızı, serbest haldeki ilacın dokulara dağılımı (K_p) gibi parametrelerle tanımlanır. PBPK modelinde, kas, beyin, deri, kemik, yağ, böbrek, kalp, dalak, ince bağırsak ve karaciğer gibi organlar yer alır. Resim 4.11'de PBPK modeli şematik olarak gösterilmektedir. Resim 4.12Resim 4.17'de sunulan sekmelerde gösterildiği gibi, karaciğer, böbrek, karaciğer atardamarı, aort gibi organ ve damarların özelliklerinde değişiklikler yapılabilir.



Resim 4.11. PBPK modelinin şematik gösterimi

PBPK modelinde karaciğerin özellikleri



Liver

Q = 25.482

V = 1664.39

Tissue Parameters for: Liver

Basic

Advanced

Enzymes

Transporters

Name:

Kp:

Fu Tissue:

Blood Flow (mL/s):

Volume (mL):

CLint (L/h):

Set Defaults

PStc (mL/s):

Apical:

Resim 4.12. PBPK modelinde karaciğerin genel özellikleri

Tissue Parameters for: Liver

Basic

Advanced

Enzymes

Transporters

Enzyme	Expression (mg-enz/g-tissue)	Expression CV (%)	Turnover rate [1/min]	Expression Source/Type
1A2	1.15E-01	67	0.0005	Default Adult
2A6	7.70E-02	84	0.0005	Default Adult
2B6	2.40E-02	147	0.0005	Default Adult
2C8	5.10E-02	81	0.0005	Default Adult
2C9	1.54E-01	54	0.0005	Default Adult
2C19	3.00E-02	106	0.0005	Default Adult

Resim 4.13. PBPK modelinde karaciğerin enzim özellikleri

PBPK modelinde böbreklerin özellikleri

Tissue Parameters for: Kidney

Basic | Advanced | Enzymes | Transporters

Renal Filtration Estimate Method: **fup*GFR**

Name: **Kidney** Blood Flow (mL/s): **17.524**

Kp: **3.6718** Volume (mL): **285.71**

Fu Tissue: **0.0014** CLint (L/h): **0**

Renal CLsys (L/h): **0.35599**

Apical: **0.0**

PStc (mL/s): **0.0**

QUR (mL/s): **0.029**

GFR (mL/s): **1.9777**

fup: **0.05**

CLfilt (L/h): **0.35599**

Set Defaults Save Cancel

Kidney
Q = 17.524
V = 285.714

Resim 4.14. PBPK modelinde böbreğin genel özellikleri

Tissue Parameters for: Kidney

Basic | Advanced | **Enzymes** | Transporters

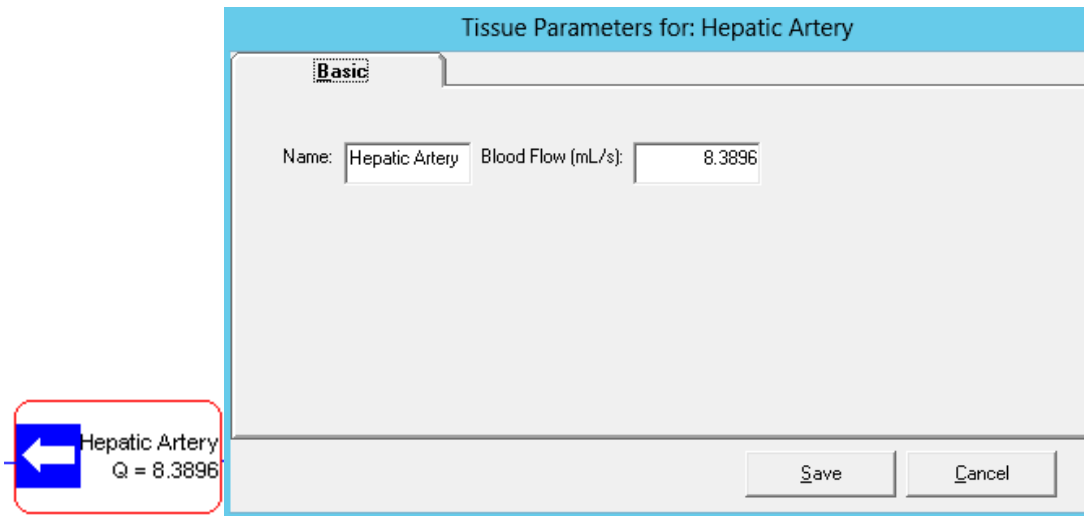
Enzyme	Expression (mg-enz/g-tissue)	Expression CV (%)	Turnover rate (1/min)	Expression Source/Type
UGT1A1	1.50E-02	43	0.0005	Default Adult Cauc
UGT1A4	2.00E-02	43	0.0005	Default Adult Cauc
UGT1A5	7.11E-04	53	0.0005	Default Adult Cauc
UGT1A6	5.23E-03	47	0.0005	Default Adult Cauc
UGT1A7	2.70E-02	53	0.0005	Default Adult Cauc
UGT1A8	1.20E-02	53	0.0005	Default Adult Cauc
UGT1A9	1.71E-01	96	0.0005	Default Adult Cauc
UGT1A10	3.60E-02	53	0.0005	Default Adult Cauc
UGT2B4	3.55E-03	53	0.0005	Default Adult Cauc
UGT2B7	1.38E-01	35	0.0005	Default Adult Cauc
UGT2B17	5.23E-04	53	0.0005	Default Adult Cauc
SULT1A1	8.69E-03	53	0.0005	Default Adult Cauc
SULT1A3	6.26E-03	58	0.0005	Default Adult Cauc
SULT1B1	6.61E-03	85	0.0005	Default Adult Cauc

Set Defaults Add Enzyme Delete Enzyme

Save Cancel

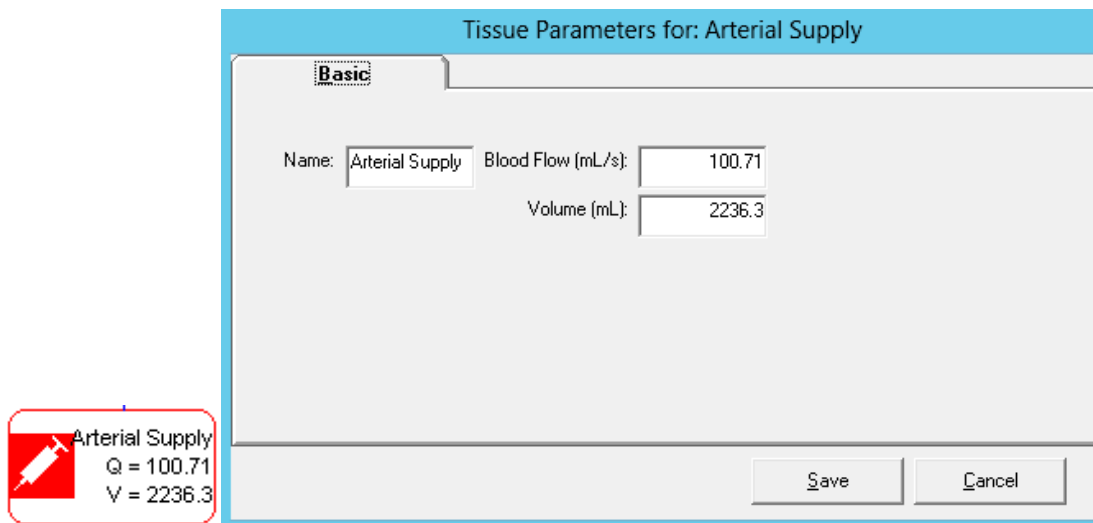
Resim 4.15. PBPK modelinde böbreğin enzim özellikleri

PBPK modelinde karaciğer atardamarının özellikleri



Resim 4.16. Karaciğer atardamarının özellikleri

PBPK modelinde aortun özellikleri



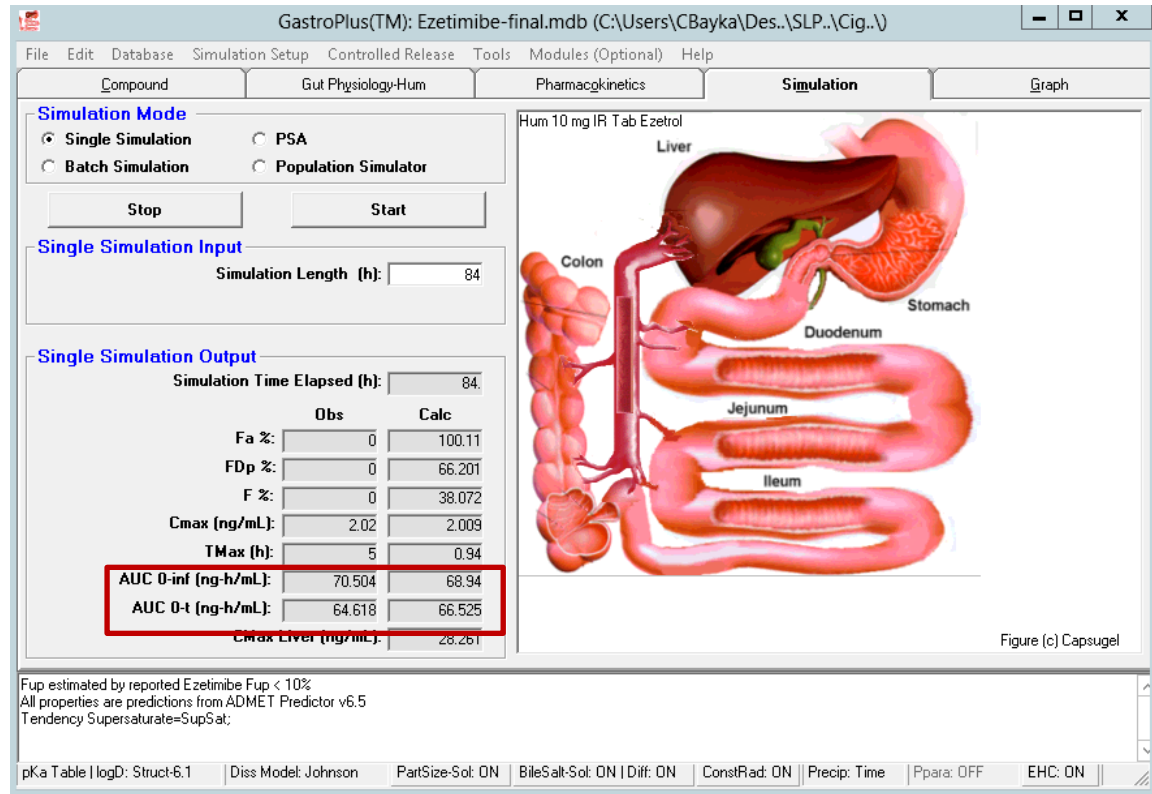
Resim 4.17. Aortun özellikleri

4.10.4. Simülasyon

Simülasyonlar, in vitro ve in silico veriler ve PBPK modeliyle elde edilen farmakokinetik parametrelere göre yapılmıştır. Simülasyonlarda, ezetimib üzerinde biyoyumlu çözünürlük ve enterohepatik sirkülasyonun etkisi incelenmiştir.

Çoklu Tekrarlı Dozla Simülasyon

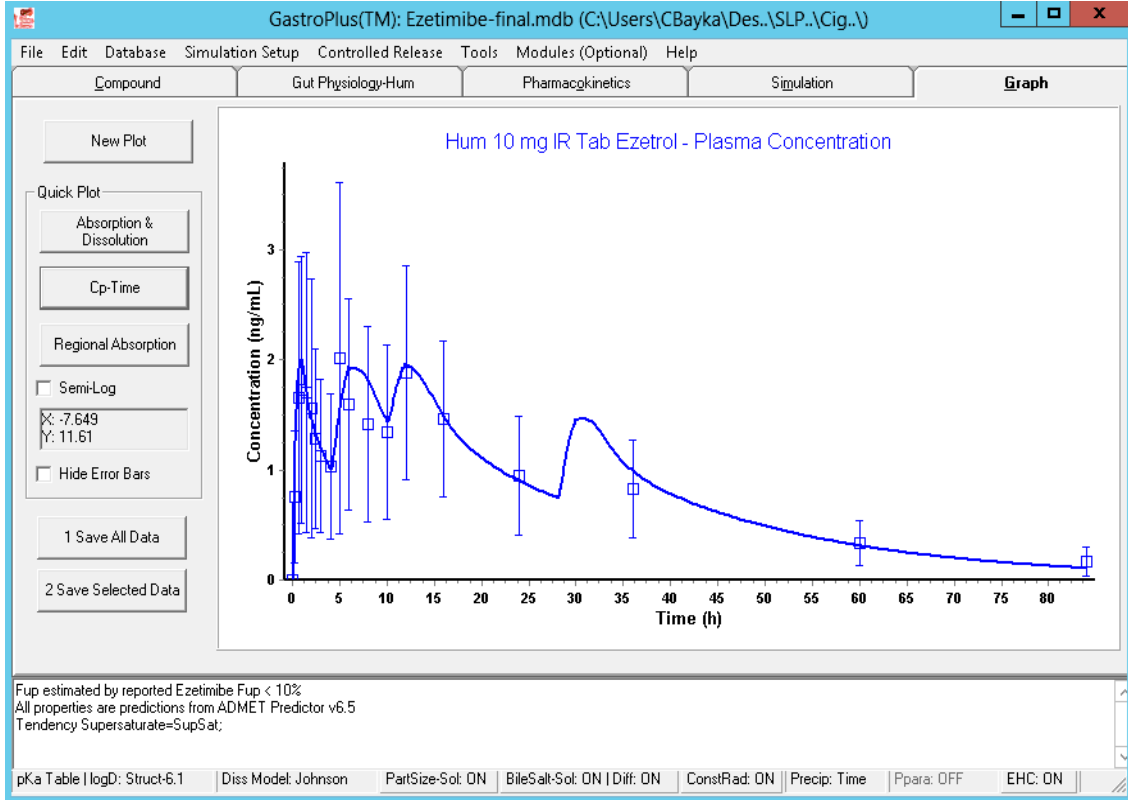
Dozaj şekli olarak çoklu tekrarlı dozun girildiği simülasyonda enterohepatik sirkülasyondan kaynaklanan pikler simüle edilebilmiştir. Resim 4.18’de simülasyon ekranı gösterilmektedir. Burada gösterildiği gibi, $AUC_{(0-inf)}$ ’ler arasındaki kestirim hatası %2,9 olarak bulunmuştur.



Resim 4.18. Ezetimib için simülasyon ekranı

Plazma Konsantrasyon Eğrisi

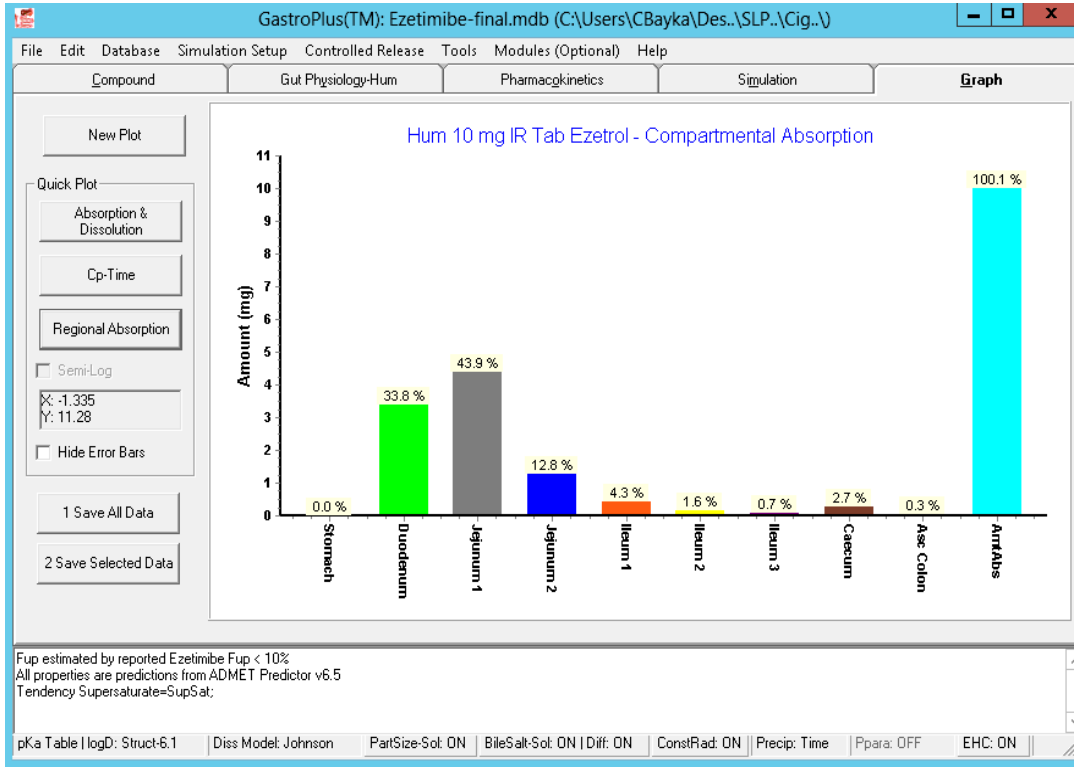
Resim 4.19'daki plazma konsantrasyonu-zaman eğrisinde gösterildiği gibi, enterohepatik sirkülasyondan kaynaklanan çoklu pikler simüle edilebilmektedir. Ayrıca, ezetimibin yüksek oranda bireyler arası değişkenlik gösterdiği de geniş güven aralıklarından açıkça görülmektedir.



Resim 4.19. Çoklu tekrarlı doz için elde edilen plazma konsantrasyon eğrisi

Bölgesel Emilim

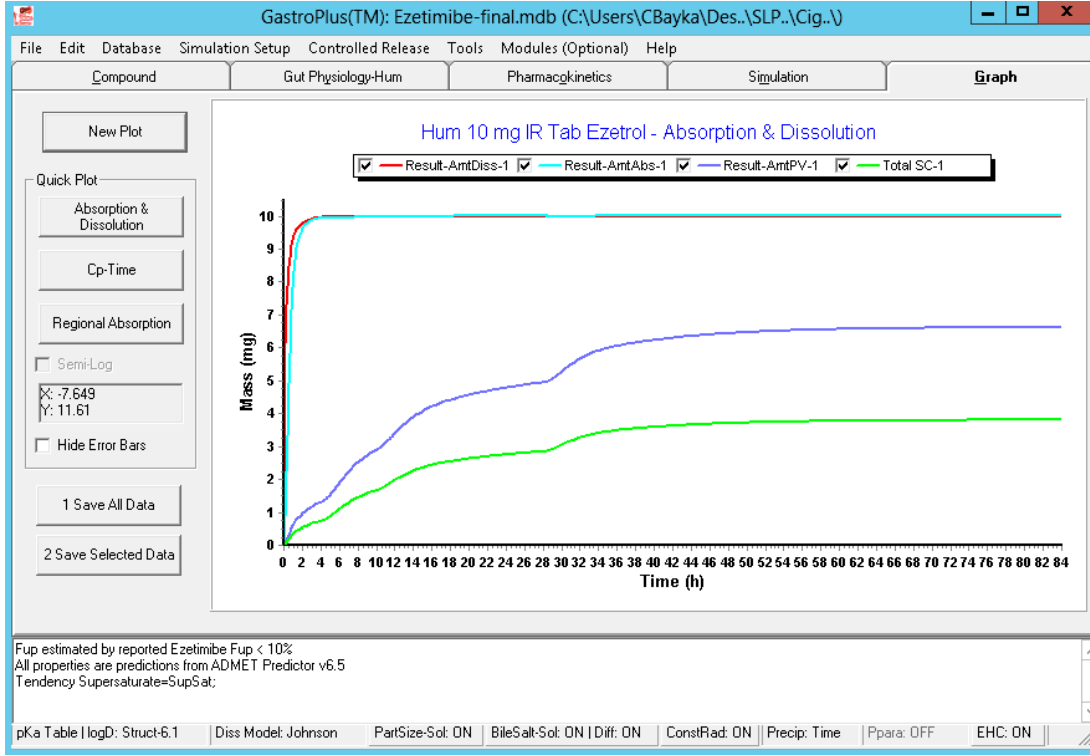
Resim 4.20’de gösterilen bölgesel emilim grafiklerine bakıldığında, ezetimib duodenum ve jejunumdan emildiği görülebilir.



Resim 4.20. Ezetimib için bölgesel emilim

Emilim ve Çözünme

Resim 4.21’de zamana karşı emilim ve çözünme grafikleri gösterilmektedir.



Resim 4.21. Emilim ve çözünme profilleri

IR Tablet Dozaj Şekliyle Simülasyon

Resim 4.22 ve 4.23’te gösterildiği gibi, dozaj şekli olarak IR tablet seçilerek yapılan simülasyonda pikler simüle edilememiştir.

GastroPlus(TM): Ezetimibe-final.mdb (C:\Users\CBayka\Des..\SLP..\Cig..\)

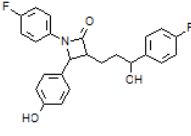
File Edit Database Simulation Setup Controlled Release Tools Modules (Optional) Help

Compound Gut Physiology-Hum Pharmacokinetics Simulation Graph

Selected Compound

Hum 10 mg IR Tab Ezetrol

Current= 6; Total = 13



Molecular Formula: C₂₄H₂₁F₂N₃O₃

Molecular Weight (g/mol): 409.44

logP (neutral): 4.31 @pH: -1

pKa Table

Enzyme Table

Transporter Table

ver. 8.6.00033

SI Trans Time (h) = 3.3 Mean Abs Time (h) = 0.428

Longest Diss. Time (h) is @ pH 4.5 = 0.453 hours

Max Abs Dose (S+) = 3.294E+3 mg Max Abs Dose (IR) = 1.122E+3 mg

Support Files

Hum 10 mg IR Tab Ezetrol.opd Hum 10 mg IR Tab Ezetrol.mdd

Dosage Form: IR: Tablet

Initial Dose (mg): 10

Subsequent Doses (mg): 0

Dosing Interval (h): 0

Dose Volume (mL): 250

pH for Reference Solubility: 6.53

Solubility (mg/mL @pH=6.53): 0.0945

Mean Precipitation Time (sec): 900

Diff. Coeff. (cm²/s x 10⁻⁵): 0.65

Drug Particle Density (g/mL): 1.2

Particle Size: R=10.00, D=20.00

Effective Permeability

Source: Human

Peff (cm/s x 10⁻⁴): 3.88

Sim Peff x10⁻⁴ (Human): 3.88

Convert from User Data

Biorelevant Solubilities

Dose No. = 0.4238

Absorption No. = 7.711

Dissolution No. = 7.289

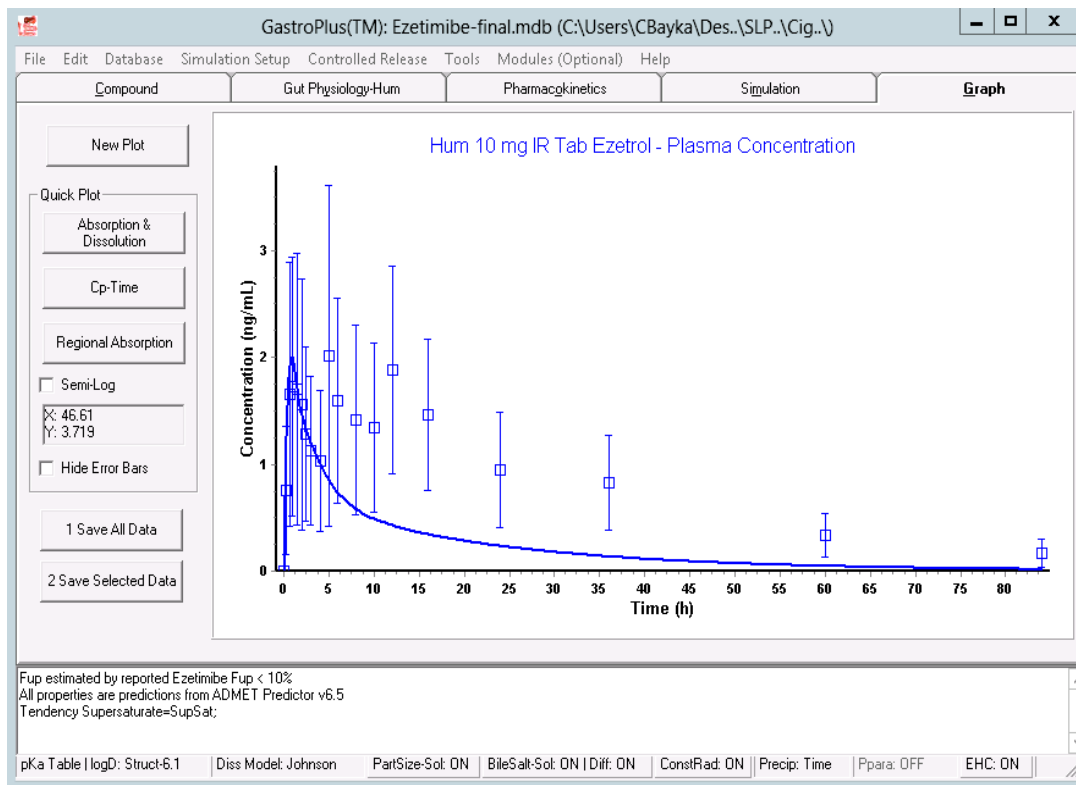
Fup estimated by reported Ezetimibe Fup < 10%

All properties are predictions from ADMET Predictor v6.5

Tendency Supersaturate=SupSat

pKa Table | logD: Struct-6.1 | Diss Model: Johnson | PartSize-Sol: ON | BileSalt-Sol: ON | Diff: ON | ConstRad: ON | Precip: Time | Ppara: OFF | EHC: ON

Resim 4.22. IR tablet için molekül özellikleri ekranı



Resim 4.23. IR tablet için elde edilen plazma konsantrasyon eğrisi

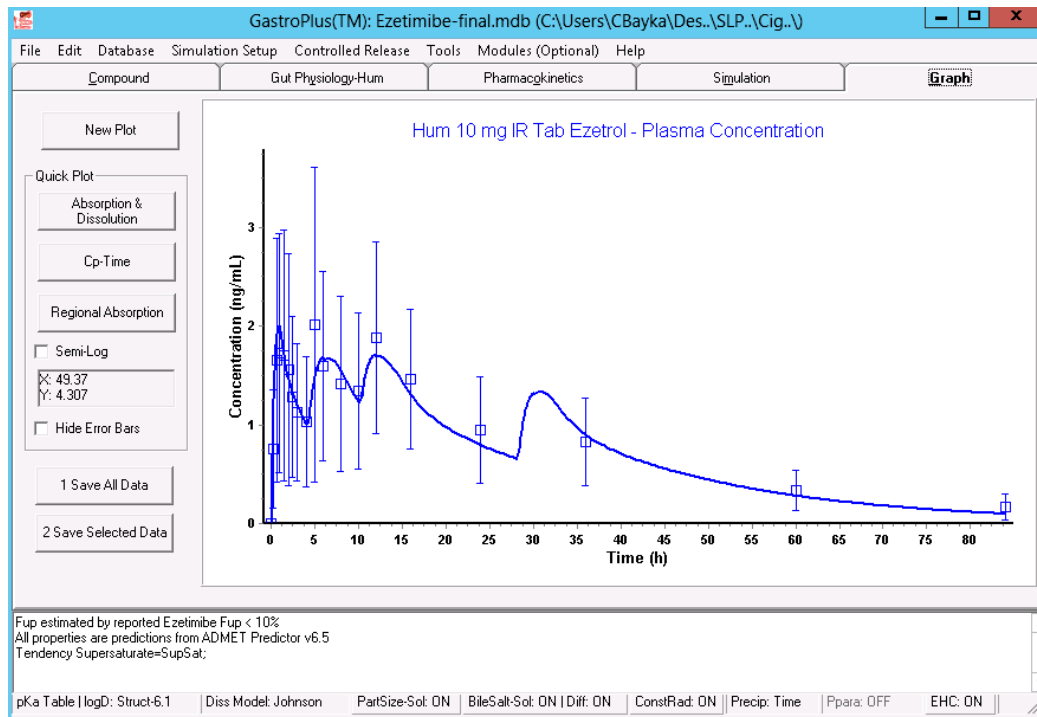
Resim 4.23'te görüldüğü gibi, dozaj şekli olarak IR Tablet'in seçildiği simülasyonda ezetimibin enterohepatik sirkülasyona girmesinden kaynaklanan piklerin simüle edilemediği açıkça görülmektedir.

Biyoyoumlu çözünürlük

Biyoyoumlu çözünürlük sonuçları hem in vitro olarak shake-flask metoduyla çalışılmış hem de ADMET Predictor™'la hesaplanmıştır. İn vitro sonuçlar, ADMET Predictor™'la hesaplanan sonuçlara göre daha düşüktür (Çizelge 4.21). Buna rağmen elde edilen eğriler benzerdir.

Çizelge 4.21. İn vitro ve in siliko çözünürlük sonuçları

Ortam	İn vitro çözünürlük (mg/mL)	İn siliko çözünürlük (mg/mL)
SGF (pH 1,2)	0,001	0,003
FaSSIF (pH 6,5)	0,050	0,029
FeSSIF (pH 5,0)	0,039	0,100



Resim 4.24. İn vitro çözünürlük verileriyle elde edilen plazma konsantrasyon eğrisi

5. TARTIŞMA

Geliştirilen farmasötik ürünlerin performanslarını, kalitesini ve etkinliğinin değerlendirilmesinde in vitro çözünme hızı çalışmaları ve biyoyararlanım çalışmaları önemli rol oynar. Dozaj şeklinin in vitro çözünme hızı verileriyle in vivo performansı arasında kurulan bir korelasyon, biyoyararlanım çalışması gerektiren bir çok ürün için in vitro verilerle in vivo ürün performansının tahminine olanak sağlar. Bu amaçla, ilacın özellikle in vivo ortamları en iyi şekilde taklit eden biyoyumlu in vitro çözünme ortamlarındaki performansı ile in vivo biyofarmasötik ve farmakokinetik performansı arasındaki ilişkiyi ortaya koyan IVIVC çalışmaları oldukça önemlidir. Burada, Gastrointestinal Simülasyon Teknolojisi (GST) bir dozaj formunun çözünme, salım, emilim, dağılım, metabolizma ve atılım süreçlerini modellemeyi ve sonrasında dozaj şeklinin vitro özellikleriyle in vivo performansı arasında ilişki kurmayı hedefler.

Bu çalışmanın temel amacı, in vivo plazma konsantrasyon verileri Zentiva Sağlık Ürünleri tarafından sağlanan ezetimib molekülü için klasik ve biyoyumlu in vitro çözünme ortamlarından elde edilen in vitro çözünme hızı verilerini kullanarak bilgisayar simülasyonlarıyla farmasötik değerlendirmeler yapabilmektir. Seçilen model madde ezetimib için farmakokinetik modelleme ve IVIVC değerlendirmesi yaparak, biyoyumlu çözünme ortamlarının korelasyona olan etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla tüm vücudu simüle eden bir PBPK modeli olan GastroPlus™ programında ACAT modeli kullanılmıştır. ACAT modeli emilim, fizyolojik ve fizikokimyasal özellikler yanında çözünme hızı, çözünme hızı üzerinde pH etkisi, kontrollü salım, mide ve kalın bağırsakta emilim, ince bağırsak ve karaciğer metabolizması, ince bağırsakta degradasyon, emilim yüzey alanı, taşıyıcı ve efluks proteinlerinin yoğunluğu ve diğer bölgesel etmenlerin ilaç emilimi üzerindeki etkileri de göz önüne alınır. ACAT modelinde ilaç emilimi, mide-barsak kanalını seri bağlı kompartmanlara ayırarak modellenir [82, 83].

ACAT modelinde, etkin maddenin, çözünürlük, permeabilite, logP, pK_a, partikül büyüklüğü, doz gibi özellikleri çözünme hızı ve emilim modellerine girdi olarak girilir. Çözünme hızı, Nerst-Brunner denklemine (Eşitlik 3) göre modellenir. Emilim ise, etkin maddenin mide-bağırsak kanalının belirli bölümlerindeki permeabilitesi ve konsantrasyon farkı temel alınarak modellenir [86]. Etkin maddenin dozaj şeklinden salınmamış, çözünmemiş ve çözünmüş halleri göz önüne alınır. Bu modelde, oral emilim, dozaj

şeklinden ilaç salımı, çözünürlük, çözünme hızı, çökme hızı, kimyasal stabilite, permeabilite, taşıyıcı etkisi (influks-efluks), ince bağırsaktaki metabolizma faaliyetleri diferansiyel denklemlerle tanımlanmıştır.

ADMET Predictor™, ilaç ve benzeri bileşiklerin moleküler yapılarından yola çıkarak bilgisayar simülasyonları aracılığı ile bu moleküllerin emilim, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisite (ADMET) özelliklerine ait tahminler üreten gelişmiş bir yazılımdır. Bu yazılım, molekül geliştirme aşamasında, moleküllere ait ADMET özelliklerinin belirlenmesi konusunda yardımcı olur. Molekülün yapısına göre, pK_a , $\log P/\log D$, biyoyoumlu çözünürlük, kan/plazma konsantrasyon oranı gibi parametreleri tahmin etmede kullanılır.

Bu çalışmada, öncelikle in vitro çözünürlük ve çözünme hızı çalışmaları deneysel olarak yapılmıştır. ADMET Predictor™ ile in siliko çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Biyoeşdeğerlik çalışmasından elde edilen in vivo verilerinin de değerlendirilmesiyle model madde olarak seçilen ezetimib için fizyolojik temelli farmakokinetik bir model oluşturulması amaçlanmıştır.

Model madde olarak seçilen ezetimib, düşük çözünürlük ve yüksek permeabilite özelliği gösteren BCS Sınıf 2'ye ait bir etkin maddedir. Ezetimib fizyolojik pH aralığında iyonlaşmaz. pH 1,2'de çözünmez ve pH 6,5'daki çözünürlüğü de düşüktür. Bu nedenle, BCS alt sınıflandırmasına göre de BCS Sınıf 2c'ye dahil edilebilir. Çözünürlük probleminin dolaylı, in vitro çözünme hızı çalışmalarında SLS içeren klasik ortamlar önerilmektedir. Safra tuzu ve lesitin içeren in vivo'ya daha yakın biyoyoumlu ortamlardaki ezetimibin davranışı ve in vivo emilim tahmin açısından kesin bir değerlendirme de bulunmamaktadır. Ayrıca, ezetimib, çözünürlük probleminin yanı sıra ilk geçiş etkisine maruz kalan, enterohepatik sirkülasyona giren bir molekül olup metabolizma ve taşıyıcı kinetiği açısından da oldukça karmaşık özelliktedir [29, 101, 107].

Yapılan çalışmalar kapsamında, öncelikle ezetimib molekülü için HPLC metot validasyonu yapılmış ve validasyon parametreleri değerlendirilmiştir.

IVIVC değerlendirmelerini yapabilmek amacıyla öncelikle fizyolojik temelli farmakokinetik model oluşturabilmek için yapılan/değerlendirilen çalışmalar 3 grup altında sınıflandırılmıştır:

1. İn vitro çalışmalar:

- 6 farklı ortamda (pH 1,2 + %0,45 SLS, pH 2,8+ %0,45 SLS, pH 4,5 + %0,45 SLS, pH 6,8+SL+ %0,45 SLS, FaSSIF ve FeSSIF) yapılan çözünürlük alışmaları,
- Üçü klasik ikisi biyouyumlu ortam olmak üzere toplam 5 farklı ortamda (pH 2,8+ %0,45 SLS, pH 4,5 + %0,45 SLS, pH 6,8+SL+ %0,45 SLS, FaSSIF ve FeSSIF) iki farklı ürünün (Ezetimib 10 mg Tablet (Zentiva) ve Ezetrol 10 mg Tablet (MSD)) in vitro çözünme hızı çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

2. İn siliko alışmalar: Bu alışmalar, literatürden sağlanamayan veya in vitro olarak ölçülemeyen verilerin tahmin edilmesine yönelik kestirim çalışmalarını kapsamaktadır. Ezetimib, çok düşük çözünürlüklü bir etkin madde olduğu ve fizyolojik pH'da iyonlaşmadığı için pH-çözünürlük profiline deneysel veri girilmemiş, ADMET Predictor™'la hesaplanan pK_a ve referans çözünürlük değerleri kullanılarak pH-çözünürlük eğrisi uyarlanmıştır. Ayrıca, ezetimibin logP ve efektif permeabilite değerleri de ADMET Predictor™ kullanılarak molekülün yapısına göre tahmin edilmiştir.

3. İn vivo alışmalar: Zentiva Sağlık Ürünleri tarafından geliştirilen Ezetimib 10 mg tablet ürününün MSD'ye ait Ezetrol 10 mg tablet ürünüyle biyoeşdeğer olduğunu göstermek için 18-55 yaş arası, 44 erkek gönüllü üzerinde, açlık durumunda gerçekleştirilmiş olan tek dozlu, iki yönlü, çapraz tasarımlı biyoeşdeğerlik çalışmasından elde edilmiş plazma konsantrasyon verileri kullanılmıştır.

İn vitro, in siliko ve in vivo verilerin değerlendirilmesine yönelik olarak farmakokinetik modelleme çalışmaları iki aşamalı olarak yürütölmüştür:

- *ZTV01 molekülüne ait modelleme çalışmaları:* Tez kapsamında GastroPlus™'ın kullanımının öğrenilmesi amacıyla Zentiva Sağlık Ürünleri'ne ait BCS Sınıf 1'e ait, uzun salım yapan ve göreceli kolay bir molekül olan ZTV01 molekülü üzerinden modelleme çalışmaları yapılmıştır. Bu molekülle deneyim kazanıldıktan sonra ezetimibin modellenmesine geçilmiştir.
- *Ezetimib molekülüne ait modelleme çalışmaları:* GastroPlus™ programı, mide bağırsak kanalını seri bağlı, anatomik ve fizyolojik olarak anlamlı kompartımanlara ayıran ACAT modeline göre çalışmaktadır. Programda hem klasik kompartmental farmakokinetik hem de PBPK modelleme yapılabilmektedir. Ezetimib için PBPK modelleme esas alınmıştır.

Model oluşturmak için, in vitro ölçüm ve in siliko tahmin yöntemleriyle elde edilen molekül özelliklerinin programa girilmesi, fizyolojinin seçilmesi ve farmakokinetik parametrelerin tahmin edilmesi gerekir. Modelin doğruluğu teyit edildikten sonra IVIV korelasyonun diğer aşamalarına geçilebilir. GastroPlus™'ın çeşitli özellikleri kullanılarak enterohepatik sirkülasyon ve enzim etkisi simüle edilmiştir. Ezetimib için oluşturulan modelde ortalama plazma konsantrasyon eğrisi simüle edilmiştir.

5.1. HPLC metot validasyonu

Ezetimibe ait standart doğrular pH 2,8 + %0,45 SLS, pH 4,5 + %0,45 SLS, pH 6,8 + %0,45 SLS, FaSSIF ve FeSSIF ortamlarında, %60 - %120 aralığında 7 noktayla gerçekleştirilen çalışmalar sonucu elde edilmiştir,

Kullanılan analitik yöntemin doğrusalılığı, kesinliği, tekrar edilebilirliği istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Doğrusallık değerlendirmesinde, 12 – 24 µmL konsantrasyon aralığında regresyon doğrusuna ait r^2 değerleri tüm ortamlar için 0,999 olarak bulunmuştur.

Yöntemin kesinliği, tekrarlanabilirlik ve tekrar edilebilirlik parametreleriyle değerlendirilmiş ve X_{ort} , SS %VK'ları hesaplanarak değerlendirilmiştir. %VK değerleri %2'den küçük bulunmuştur.

Yöntemin özgünlük ve seçiciliği etkin madde içeren ve içermeyen örneklerde gösterilmiştir.

Ezetimibin 25°C’de 48 saat gerçekleştirilen stabilite çalışmasında, etkin maddenin belirtilen koşullarda dayanıklı olduğu gösterilmiştir.

5.2. Çözünürlük

Çözünürlük çalışmaları klasik ortamlar (pH 1,2; pH 2,8; pH 4,5 ve pH 6,8) ve biyoyumlu ortamlarda (FaSSIF ve FeSSIF) değerlendirilmiştir. Klasik ortamlarda, ortama yüzey etkin madde eklenmediği zaman pik elde edilememiştir. Bu nedenle çalışmalar, ortamlara FDA tarafından pH 4,5 için önerilen %0,45 oranında SLS eklenerek gerçekleştirilmiştir. Çözünürlük değerleri klasik çözünme ortamlarında pH 6.8 (0.0130 mg/mL) hariç oldukça düşük (0.001-0.004 mg/mL) iken FaSSIF ve FeSSIF ortamlarında da sırasıyla 0.050 mg/mL ve 0.039 mg/mL olarak bulunmuştur (Çizelge 4.8). Ezetimib, çok düşük çözünürlüklü bir etkin madde olduğu ve fizyolojik pH’da iyonlaşmadığı için pH-çözünürlük profiline deneysel veri girilmemiş, ADMET Predictor™’la hesaplanan pK_a ve referans çözünürlük değerleri kullanılarak pH-çözünürlük eğrisi uyarlanmıştır.

5.3. İn vitro çözünme hızı

İn vitro çözünme hızı testleri, $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ sıcaklıkta 500 ml’lik çözünme ortamında 50 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. 5, 10, 15, 20, 30, 45 ve 60. dakikalarda örnekler alınmış ve örnekler 0,45 μm ’lik PET filtreden (Macherey-Nagel Chromafil PRT-45/25 Polyester) süzölmüştür. Analizler, 230 nm dalga boyunda UV dedektörü kullanılarak HPLC sisteminde yapılmıştır. %0,45 oranında SLS içeren klasik ortamlarda, hem Ezetimib hem Ezetrol için 15 dakikada %85’lik çözünme hızına ulaşılmıştır (Şekil 4.21, Şekil 4.22). Referans ve test ürünlerinin çözünme davranışları arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Biyoyumlu ortamlarda ise referans ve test ürünleri benzer davranış gösterse de (f_2 değerleri, FaSSIF için 87, FeSSIF için 57’dir) de çözünme hızı yüzey etkin madde içeren klasik ortamlara göre çözünme hızı daha yavaştır. Bu farklılık, SLS’nin sodyum taurokolat ve lesitin gibi doğal yüzey etkin maddelere göre daha kuvvetli bir yüzey etkin madde olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir.

5.4. İn siliko çalışmalar

5.4.1. ADMET Predictor™'la yapılan tahminler

Ezetimibin çözünürlüğü çok düşüktür. Bu nedenle çözünme hızı çalışmaları klasik ortamlara yüzey etkin madde eklenerek gerçekleştirilmiştir. Ezetimibin çözünürlüğü SLS içeren ortamlarda pH'ya bağımlı olarak artsa da ezetimibin, fizyolojik pH'da iyonlaşmadığı bilinmektedir [102]. Bu nedenle pH-çözünürlük profiline deneysel veri girilmemiş, ADMET Predictor™'la hesaplanan pK_a ve referans çözünürlük değerleri kullanılarak pH-çözünürlük eğrisi uyarlanmıştır (Resim 4.2).

Biyouyumlu ortamlardaki çözünürlük ise hem deneysel olarak ölçülmüş hem de in siliko olarak hesaplanmıştır. Tüm değerler mikrogram düzeyinde olmasına rağmen, molekülün yapısında göre ADMET Predictor™'la hesaplanan değerler, ölçülen değerlere göre daha 2.5 ile 3 kat daha yüksektir ve bu değerlerle yapılan simülasyonların deneysel verilerle daha uyumlu sonuç verdiği gözlenmiştir (Resim 4.19 ve Resim 4.24).

Ezetimibin logP ve efektif permeabilite değerleri de ADMET Predictor™ kullanılarak molekülün yapısına göre tahmin edilmiştir (Çizelge 4.20).

5.4.2. Farmakokinetik parametrelerin tahmin edilmesi ve modelleme

IVIVC kurulabilmesi için plazma konsantrasyon verilerinin dekonvolüsyon işlemiyle in vivo emilim eğrilerine dönüştürülmesi gerekmektedir. Bu işlemin yapılabilmesi için, öncelikle, çalışılan moleküle uygun, doğruluk oranı yüksek bir farmakokinetik model oluşturulmalıdır. Model oluşturmak için, in vitro ölçüm ve in siliko tahmin yöntemleriyle elde edilen molekül özelliklerinin programa girilmesi, fizyolojinin seçilmesi ve farmakokinetik parametrelerin tahmin edilmesi gerekir. Modelin doğruluğu teyit edildikten sonra IVIV korelasyonun diğer aşamalarına geçilebilir.

GastroPlus™'ta PKPlus modülü kullanılarak kompartımanlı farmakokinetik modelleme yapılması mümkündür. Kompartımanlı farmakokinetik modelleme daha eski ve uygulaması görece daha basit bir tekniktir. Bu kapsamda, ZTV01 etkin maddesinin 0,6 mg'lık IV infüzyon verisi kullanılarak çalışmalar yapılmış, klirens, dağılma hacmi ve kompartımanlar arası hız sabitleri gibi farmakokinetik parametreler program tarafından

hesaplanmıştır. Bu değerler kullanılarak oral dozaj şekli için plazma konsantrasyon eğrileri tahminleri yapılmıştır.

Ezetimib, düşük çözünürlüklü bir etkin madde olduğu için IV uygulaması bulunmamaktadır [1]. Bu durum kompartmental modellemeyi zorlaştırmaktadır. Ayrıca kompartmental modellemede fizyolojik ve anatomik özellikler göz önüne alınmaz. PBPK modellemede ise, kompartmentların pH, hacim, permeabilite gibi özellikleri daha önceden yapılmış çalışmalar temel alınarak oluşturulmuştur. Kompartmanlar arasında ilaç geçişi, birinci dereceden diferansiyel denklemlerle tanımlanmış olup, geçiş süreleri fizyolojik değerler göz önüne alınarak belirlenmiştir. Ayrıca, modelin içerisine popülasyondaki bireyler arası farklılıkları farklı değerler atayarak temsil edecek parametreler eklenebilir. Bu çalışma da elde edilen modelin doğrulamak için kullanılacak ezetimib in vivo deney sonuçları incelendiğinde hem bireylerarası kan konsantrasyonu zaman eğrileri (Şekil 4.25, Şekil 4.26) hem de AUC, C_{max} , t_{max} gibi temel parametreleri (Çizelge 4.21) açısından yüksek değişkenliğe sahip olduğu görülmüştür. Bu da ilerleyen aşamalarda bireye özgü parametre değerleri belirlenebilen modellere ihtiyaç duyulacağını göstermektedir.

Ezetimib için GastroPlus™'ta bulunan PBPKPlus modülü kullanılmış ve fizyolojik temelli farmakokinetik modelleme çalışmaları yapılmıştır. Öncelikle, etkin maddenin fizyokimyasal özellikleri, ilaç biyotransformasyonuna ait bilgileri içeren parametreler ve fizyolojik ve anatomik bilgileri içeren parametreler programa girilmiştir.

Modellemenin ilk aşamasında ezetimibe ait fizyokimyasal özellikler belirlenmiştir. Ezetimibe ait diğer farmakokinetik özellikler, ADMET Predictor™ kullanılarak belirlenmiştir. Bu program molekül yapısının 2 boyutlu veya 3 boyutlu olarak tarif edildiği model dosyalarını, doğrusal olmayan ve istatistiksel yapay zeka yöntemleri içeren matematiksel modellerin girdisi olarak kullanarak bu tahmini değerleri oluşturmaktadır. Programa, ezetimibin molekül yapısı girilmiştir ve moleküle ait pK_a , $\log P/\log D$, efektif permeabilite (P_{eff}), biyouyumlu ortamlardaki çözünürlük değerleri, kan/plazma konsantrasyon oranı, kan plazma proteinlerine bağlanma oranı gibi parametreler in siliko olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.20).

İlacın vücuttaki çözünmesinin modellenebilmesi için öncelikle, mide-bağırsak kanalındaki ortama benzer in vitro bir ortamdaki çözünürlük bilgisine ihtiyaç vardır. Bunun için

çalışmanın ilk kısmında anlatılan FeSSIF ve FaSSIF ortamda gerçekleştirilen çözünme çalışmaları sonucu elde edilen çözünürlük değerleri GastroPlus™ yazılımının molekül özellikleri sekmesindeki biyoyoumlu çözünürlük ekranına girilmiştir. Çözünürlük değerleri, aynı zamanda ADMET Predictor™ kullanılarak in siliko olarak da belirlenmiştir. ADMET Predictor™'la elde edilen değerler in vitro ölçümlere göre daha yüksek bulunmuştur. İlerleyen kısımlarda bahsedilen diğer tüm parametrelere aynı değerler girilerek, elde edilen iki farklı biyoyoumlu ortam çözünürlük datası kullanılarak PBPK tabanlı simülasyon tekrarlanmış ve elde edilen sonuçlar Resim 4.19 ve Resim 4.24'te gösterilmiştir. Sonuçlar hem in siliko hem de in vitro yöntemler ile elde edilen verilerin benzer model çıktıları ortaya koyduğunu göstermektedir. Sonuçta, yapılan bu biyoyoumlu ortamlar kullanılarak ileride farklı ilaç formülasyonları ile yapılacak in vitro çalışmalarda da benzer çözünürlük değerleri elde edilebilirse, in siliko çözünürlüklere eşdeğer plazma konsantrasyonu eğrileri beklenmesinin doğru olacağını göstermektedir.

Ezetimib molekülünün bir diğer özelliği de enterohepatik sirkülasyona girmesidir. Ezetimib, ince bağırsakta bulunan UGT1A1, UGT1A3 ve UGT2B15 enzimleri tarafından fenolik glukuronide dönüştürülür. UGT metabolitleri, safra veya böbrekler yoluyla MRP (multi-drug resistance) proteinleri tarafından atılabilir. Ayrıca, safrayla atılan glukuronid metabolitleri, enterohepatik sirkülasyona girerek, ince bağırsakta bulunan beta glukuronidaz enzimleri tarafından hidrolize uğrayarak yeniden ana ilaca dönüştürülür ve ince bağırsakta yeniden emilim görülür. İnce bağırsakta gerçekleşen bu dönüşümden sonra, ana ilaç ve aktif metaboliti karaciğere taşınır. Ana ilacın glukuronide dönüştürme işlemi burada da devam eder. Ezetimib-glukuronid, daha sonra safrayla birlikte enterohepatik sirkülasyona girerek yeniden ince bağırsağa gönderilir. Bu durum, emilim eğrisinde çoklu pik oluşumuna neden olur [1, 110].

Enterohepatik sirkülasyon nedeniyle oluşan bu çoklu pikler, GastroPlus™'ta dozaj şekli olarak çoklu tekrarlı doz seçilerek elde edilebilmiştir. Enterohepatik sirkülasyonda, safra boşalması önemli bir rol oynar. Safra boşalmasının %90'ından fazlasının yemekten sonraki 30 dakika içerisinde tamamlanır. Bu nedenle kan konsantrasyonunda meydana gelen pikler ve yemek yeme zamanları arasında bir senkronizasyon gözlenir [110]. Dozaj şekli olarak çoklu tekrarlı doz seçildiğinde çoklu tekrarlı doz tablosu aracılığı ile her doz alımı zamanı ve alınan doz miktarı ayrı bir satırda seçilebilmektedir. Aynı zamanda her satırda insan için açlık ve tokluk fizyolojilerinden herhangi birinin seçilmesi de mümkündür. Bu esneklik

sayesinde çoklu tekrarlı doz tablosu, Resim 4.9'deki gibi doldurulmuş ve yiyecek alım zamanları bilgisi simülasyon modeline eklenmiştir. Böylece çoklu pikler simüle edilebilmiştir. Safra salımının %90'ının ne kadar süre içerisinde tamamlanacağı da kullanıcı tarafından değiştirilebilen ayrı bir parametredir. Bu parametre ve çoklu tekrarlı doz tablosuna girilen açlık tokluk fizyolojisi zamanlamaları değiştirilerek modelleme sonucu elde edilen kan konsantrasyonu eğrisindeki piklerin zamanlamalarının deneklerde görülen ortalama zamanlamalar ile aynı hizaya getirilmesi çalışılması yapılmış ve en iyi sonuçlar fizyoloji değişim zamanları için 0, 4, 8, 12, 28 saatleri safra boşaltım süresi için ise varsayılan değeri olan 30 dakika kullanıldığında elde edildiği sonucu gözlenmiştir (Resim 4.19). Bu işlem yapılmaksızın, dozaj şeklinin 'IR Tablet' olarak seçildiği durumda çoklu pikler simüle edilememiştir (Resim 4.23). Resim 4.18'de gösterildiği gibi dozaj şekli olarak çoklu tekrarlı dozun girildiği simülasyonda enterohepatik sirkülasyondan kaynaklanan pikler simüle edilmiştir (Resim 4.19). Burada gösterildiği gibi, $AUC_{(0-inf)}$ 'ler arasındaki tahmin hatası %2.9 olarak bulunmuştur. Bölgesel emilim grafiklerine bakıldığında da ezetimibin duodenum ve jejunumdan emildiği görülmektedir (Resim 4.20).

Ezetimib molekülünün çözünürlük probleminden dolayı IV uygulaması bulunmadığından oral emilimin tahmininde zorluklarla karşılaşmıştır. Molekül özelliklerinin ve metabolizma kinetiğinin tanımlanmasında in siliko metotlardan yararlanılmıştır. Bu veriler girdi olarak kullanılarak ezetimib için fizyolojik temelli farmakokinetik modelleme yaklaşımıyla enterohepatik sirkülasyonu içeren bir farmakokinetik model oluşturulmuştur. Oluşturulan modelde, in vitro ve in siliko çözünürlük verileriyle (Çizelge 4.22) ortalama plazma konsantrasyon eğrisi simüle edilmiştir (Resim 4.24).

Ezetimib karmaşık bir metabolizma ve taşıyıcı kinetiği göstermektedir. Oluşturulan modelde, ezetimib metabolizması göz önüne alınmış ve ana metabolitiyle eş zamanlı simülasyon yapılmıştır; ancak mikrozomlardan elde edilmiş in vitro K_m ve V_{max} değerlerinin in vivo ekstrapolasyon yöntemine bağlı farklılıklar da olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, bireylerarası enzim ekspresyonundaki, safra boşaltım sürelerindeki farklılıklar da modelde sapmalara neden olabilmektedir. Bu modelde, literatür verilerinde yetersizlik nedeniyle taşıyıcı etkisi göz ardı edilmiştir. Sonuçta, GastroPlus™ programının birçok özelliği kullanılarak, ezetimib molekülünde enterohepatik sirkülasyondan kaynaklanan piklerin simüle edildiği, ortalama değerlerle uyumlu genel bir PBPK modeli oluşturulmuştur. Ancak ezetimibin karmaşık metabolizma

kinetiği ve yüksek değişkenlik özellikleri nedeniyle, bireyler için tek tek model oluşturulması ve taşıyıcı etkisinin de simülasyona eklenmesiyle modelin geliştirilmesinden sonra IVIVC çalışmalarına ait değerlendirilmelerin yapılabileceği sonucuna varılmıştır.

6. SONUÇ

Bu çalışmanın temel amacı, in vivo plazma konsantrasyon verileri Zentiva Sağlık Ürünleri tarafından sağlanan ezetimib molekülü için klasik ve biyoyumlu in vitro çözünme ortamlarından elde edilen in vitro çözünme hızı verilerini kullanarak bilgisayar simülasyonlarıyla farmasötik değerlendirmeler yapabilmektir. Ayrıca, ezetimib için farmakokinetik modelleme ve IVIVC değerlendirmesi yaparak, biyoyumlu çözünme ortamlarının korelasyona olan etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, ADMET Predictor™ ile in siliko çalışmalar gerçekleştirilmiş ve GastroPlus™ programı kullanılarak, tüm vücudu simüle eden fizyolojik temelli farmakokinetik modellemede GastroPlus™ ACAT modeli kullanılarak aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

- Ezetimib için in vitro çalışmalar, in siliko çalışmalarda ADMET Predictor™ ile yapılan kestirimler ve Zentiva Sağlık Ürünleri'nin sağladığı in vivo veriler kullanılarak GastroPlus™'la fizyolojik temelli farmakokinetik modellemede PBPKPlus modülü kullanılarak enterohepatik sirkülasyonu ve metabolizma kinetiklerini göz önüne alan bir farmakokinetik model oluşturulmuştur.
- Oluşturulan fizyolojik temelli farmakokinetik modelde, ortalama plazma konsantrasyon eğrisi simüle edilmiştir.
- Bireyler arası varyasyon, yüksek değişkenlik, bireylerarası enzim ekspresyonundaki ve safra boşaltım sürelerindeki farklılıkların geliştirilen farmakokinetik modeldeki sapmaların nedeni olduğu düşünülmektedir.
- Yukarıda belirtilen faktörlerin yanı sıra, ezetimibin karmaşık metabolizma kinetiği ve yüksek değişkenlik göstermesi nedeniyle, ortalama değerler yerine bireyler için tek tek model oluşturulmasının farmakokinetik model oluşturma ve simülasyon açısından daha uygun sonuçlar verebileceği düşünülmektedir.
- Tüm bu değerlendirmeler yanında, taşıyıcı etkisinin de simülasyona eklenmesiyle modelin geliştirilmesinden sonra IVIVC değerlendirilmelerinin yapılabileceği sonucuna varılmıştır.

- Yeni ilaç formülasyonlarının geliştirilmesinde ve dozaj şeklinin in vitro/in vivo performans değerlendirmelerinde biyouyumlu ortamlarda yapılan biyofarmasötik değerlendirmeler, klasik çözünme ortamlarında yapılan değerlendirmelere göre daha doğru bir yaklaşımdır.
- Biyouyumlu çözünme ortamları kullanılarak yapılan in vitro çalışmaların in siliko yaklaşımlarla birlikte kullanılması, in vivo'ya daha yakın kestirimler ve simülasyonlar yapılmasını sağlamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Kosoglou, T., Statkevich, P., Johnson-Levonas, A. O., Paolini, J. F., Bergman, A. J. and Alton, K. B. (2005). Ezetimibe: A Review of Its Metabolism, Pharmacokinetics and Drug Interactions. *Clinical Pharmacokinetics*, 44(5), 467-494.
2. Ungell, A. L. and Abrahamsson, B. (2004). Biopharmaceutical Support in Candidate Drug Selection In, *Pharmaceutical Preformulation and Formulation*. Florida, USA: Interpharm/CRC Preess 97-143.
3. Banakar, U. V. (1992). *Pharmaceutical Dissolution Testing* (1). New York: Marcel Dekker, Inc., 1.
4. Amidon, G. L., Lennernas, H., Shah, V. P. and Crison, J. R. (1995). A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. *Pharmaceutical Research*, 12(3), 413-420.
5. Martinez, M. N. and Amidon, G. L. (2002). A Mechanistic Approach to Understanding the Factors Affecting Drug Absorption: A Review of Fundamentals. *Journal of Clinical Pharmacology*, 42(6), 620-643.
6. Horter, D. and Dressman, J. B. (2001). Influence of Physicochemical Properties on Dissolution of Drugs in the Gastrointestinal Tract. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1-3), 75-87.
7. Acartürk, F., Ağabeyoğlu, İ., Çelebi, N., Değim, T., Değim, Z., Doğanay, T., Takka, S. and Tırnaksız, F. (2009). *Modern Farmasötik Teknoloji* (2). Ankara: Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi, 407-452.
8. Kostewicz, E. S., Brauns, U., Becker, R. and Dressman, J. B. (2002). Forecasting the Oral Absorption Behavior of Poorly Soluble Weak Bases Using Solubility and Dissolution Studies in Biorelevant Media. *Pharmaceutical Research*, 19(3), 345-349.
9. Avdeef, A. (2012). *Absorption and Drug Development* (Second Edition). New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 10-20.
10. Noyes AA, W. W. (1897). The Rate of Solution of Solid Substances in Their Own Solutions. *Journal of the American Chemical Society*, 19 (12) 930-934.
11. Dokoumetzidis, A. and Macheras, P. (2006). A Century of Dissolution Research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System. *International Journal of Pharmaceutics*, 321(1-2), 1-11.
12. Dressman, J. B., Amidon, G. L., Reppas, C. and Shah, V. P. (1998). Dissolution Testing as a Prognostic Tool for Oral Drug Absorption: Immediate Release Dosage Forms. *Pharmaceutical Research*, 15(1), 11-22.

13. Dressman, J. B., Vertzoni, M., Goumas, K. and Reppas, C. (2007). Estimating Drug Solubility in the Gastrointestinal Tract. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(7), 591-602.
14. Jones, H. M., Parrott, N., Ohlenbusch, G. and Lave, T. (2006). Predicting Pharmacokinetic Food Effects Using Biorelevant Solubility Media and Physiologically Based Modelling. *Clinical Pharmacokinetics*, 45(12), 1213-1226.
15. Lindahl, A., Ungell, A. L., Knutson, L. and Lennernas, H. (1997). Characterization of Fluids from the Stomach and Proximal Jejunum in Men and Women. *Pharmaceutical Research*, 14(4), 497-502.
16. Perez de la Cruz Moreno, M., Oth, M., Deferme, S., Lammert, F., Tack, J., Dressman, J. and Augustijns, P. (2006). Characterization of Fasted-State Human Intestinal Fluids Collected from Duodenum and Jejunum. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58(8), 1079-1089.
17. Welling, P. G. (1996). Effects of Food on Drug Absorption. *Annual Review of Nutrition*, 16 383-415.
18. Shah, V. P. (2005). The Role of Dissolution Testing in the Regulation of Pharmaceuticals: The FDA Perspective. In J. Dressman and H. Lennernas, *Pharmaceutical Dissolution Testing*. New York: Taylor & Francis Group, LCC, 81-97.
19. Lobenberg, R. and Amidon, G. L. (2000). Modern Bioavailability, Bioequivalence and Biopharmaceutics Classification System. New Scientific Approaches to International Regulatory Standards. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50(1), 3-12.
20. Otsuka, K., Shono, Y. and Dressman, J. (2013). Coupling Biorelevant Dissolution Methods with Physiologically Based Pharmacokinetic Modelling to Forecast in-Vivo Performance of Solid Oral Dosage Forms. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(7), 937-952.
21. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration and Research (CDER). (1997). *Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms*. 8-11.
22. Klein, S. (2010). The Use of Biorelevant Dissolution Media to Forecast the in Vivo Performance of a Drug. *The AAPS Journal*, 12(3), 397-406.
23. The European Agency of Evaluation of Medicinal Products (EMA), Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). (2010). *Guideline on the Investigation of Bioequivalence* 1-27.
24. Galia E, N. E., Hörter D, Löbenberg R, Reppas C, Dressman JB (1998). Evaluation of Various Dissolution Media for Predicting in Vivo Performance of Class I and II Drugs *Pharmaceutical Research*, 15 (5) 698-705.

25. Schwebel, H. J., van Hoogevest, P., Leigh, M. L. and Kuentz, M. (2011). The Apparent Solubilizing Capacity of Simulated Intestinal Fluids for Poorly Water-Soluble Drugs. *Pharmaceutical Development and Technology*, 16(3), 278-286.
26. Karalis, V., Magklara, E., Shah, V. P. and Macheras, P. (2010). From Drug Delivery Systems to Drug Release, Dissolution, IVIVC, Bcs, Bddcs, Bioequivalence and Biowaivers. *Pharmaceutical Research*, 27(9), 2018-2029.
27. Wei, H. and Lobenberg, R. (2006). Biorelevant Dissolution Media as a Predictive Tool for Glyburide a Class II Drug. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29(1), 45-52.
28. Wagner, C., Jantratid, E., Kesisoglou, F., Vertzoni, M., Reppas, C. and J, B. D. (2012). Predicting the Oral Absorption of a Poorly Soluble, Poorly Permeable Weak Base Using Biorelevant Dissolution and Transfer Model Tests Coupled with a Physiologically Based Pharmacokinetic Model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 82(1), 127-138.
29. Diakidou, A., Vertzoni, M., Dressman, J. and Reppas, C. (2009). Estimation of Intragastric Drug Solubility in the Fed State: Comparison of Various Media with Data in Aspirates. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, 30(6), 318-325.
30. Vertzoni, M., Dressman, J., Butler, J., Hempenstall, J. and Reppas, C. (2005). Simulation of Fasting Gastric Conditions and Its Importance for the in Vivo Dissolution of Lipophilic Compounds. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60(3), 413-417.
31. Charman, W. N., Rogge, M. C., Boddy, A. W. and Berger, B. M. (1993). Effect of Food and a Monoglyceride Emulsion Formulation on Danazol Bioavailability. *Journal of Clinical Pharmacology*, 33(4), 381-386.
32. Melander, A., Brante, G., Johansson, O., Lindberg, T. and Wahlin-Boll, E. (1979). Influence of Food on the Absorption of Phenytoin in Man. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 15(4), 269-274.
33. Teksin, Z. Ş., Sarısaltık, D. and Yılmaz, S. (2011, June). *The Use of Biorelevant Dissolution Media to Forecast the in Vivo Performance of Bcs Class 2 Drug: Flurbiprofen*. Paper presented at 3rd Pharmaceutical Sciences Fair, Prague, Czech Republic.
34. İnternet: Biorelevant Media Help Establish in Vitro in Vivo Correlations. Biorelevant. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fbiorelevant.com%2Ffassif-fessif-fassgf-powder%2Festablish-in-vitro-in-vivo-correlations-ivivcs%2F&date=2014-12-25>, Son Erişim Tarihi: 2014-12-25.
35. Dressman JB, L. H. (2000). Oral Drug Absorption Prediction and Assessment. In. New York: Marcel Dekker, 146-174.
36. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration and Research (CDER). (2000). *Waiver of in Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System*. 1-16.

37. Wacher, V. J., Wu, C. Y. and Benet, L. Z. (1995). Overlapping Substrate Specificities and Tissue Distribution of Cytochrome P450 3a and P-Glycoprotein: Implications for Drug Delivery and Activity in Cancer Chemotherapy. *Molecular carcinogenesis*, 13(3), 129-134.
38. Tsume, Y., Mudie, D. M., Langguth, P., Amidon, G. E. and Amidon, G. L. (2014). The Biopharmaceutics Classification System: Subclasses for in Vivo Predictive Dissolution (Ipd) Methodology and IVIVC. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 57 152-163.
39. Rudman A, W. R. (1995). Guidance for Industry: Immediate Release Solid Dosage Forms. Scale-up and Post-Approval Changes : Chemistry, Manufacturing and Controls, in Vitro Dissolution Testing and in Vivo Bioequivalence Documentation. . *Center for Drug Evaluation and Research , Food and Drug Administration*, 1-11.
40. Lennernas, H., Crison, J. R. and Amidon, G. L. (1995). Permeability and Clearance Views of Drug Absorption: A Commentary. *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics*, 23(3), 333-343.
41. Jones, H. M., Gardner, I. B. and Watson, K. J. (2009). Modelling and Pbpk Simulation in Drug Discovery. *The AAPS Journal*, 11(1), 155-166.
42. Dokoumetzidis, A., Valsami, G. and Macheras, P. (2007). Modelling and Simulation in Drug Absorption Processes. *Xenobiotica*, 37(10-11), 1052-1065.
43. Jones, H. and Rowland-Yeo, K. (2013). Basic Concepts in Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling in Drug Discovery and Development. *CPT: Pharmacometrics and Systems Pharmacology*, 2 e63.
44. Lennernas, H., Aarons, L., Augustijns, P., Beato, S., Bolger, M., Box, K., Brewster, M., Butler, J., Dressman, J., Holm, R., Julia Frank, K., Kendall, R., Langguth, P., Sydor, J., Lindahl, A., McAllister, M., Muenster, U., Mullertz, A., Ojala, K., Pepin, X., Reppas, C., Rostami-Hodjegan, A., Verwei, M., Weitschies, W., Wilson, C., Karlsson, C. and Abrahamsson, B. (2014). Oral Biopharmaceutics Tools - Time for a New Initiative - an Introduction to the Imi Project Orbito. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 57 292-299.
45. Chen, Y., Jin, J. Y., Mukadam, S., Malhi, V. and Kenny, J. R. (2012). Application of Ivide and Pbpk Modeling in Prospective Prediction of Clinical Pharmacokinetics: Strategy and Approach During the Drug Discovery Phase with Four Case Studies. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, 33(2), 85-98.
46. Lave, T., Parrott, N., Grimm, H. P., Fleury, A. and Reddy, M. (2007). Challenges and Opportunities with Modelling and Simulation in Drug Discovery and Drug Development. *Xenobiotica*, 37(10-11), 1295-1310.
47. Rowland, M., Peck, C. and Tucker, G. (2011). Physiologically-Based Pharmacokinetics in Drug Development and Regulatory Science. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 51 45-73.

48. De Buck, S. S. and Mackie, C. E. (2007). Physiologically Based Approaches Towards the Prediction of Pharmacokinetics: In Vitro-in Vivo Extrapolation. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 3(6), 865-878.
49. Pang, K. S. and Durk, M. R. (2010). Physiologically-Based Pharmacokinetic Modeling for Absorption, Transport, Metabolism and Excretion. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 37(6), 591-615.
50. Teorell, T. (1937). Studies on the Diffusion Effect Upon Ionic Distribution : II. Experiments on Ionic Accumulation. *The Journal of General Physiology*, 21(1), 107-122.
51. Teorell, T. (1935). Studies on the "Diffusion Effect" Upon Ionic Distribution. Some Theoretical Considerations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 21(3), 152-161.
52. Bischoff, K. B., Dedrick, R. L. and Zaharko, D. S. (1970). Preliminary Model for Methotrexate Pharmacokinetics. *Journal of pharmaceutical sciences*, 59(2), 149-154.
53. Chen, H. S. and Gross, J. F. (1979). Physiologically Based Pharmacokinetic Models for Anticancer Drugs. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2(2), 85-94.
54. Wagner, J. G. (1981). History of Pharmacokinetics. *Pharmacology and Therapeutics*, 12(3), 537-562.
55. Tanaka, C., Kawai, R. and Rowland, M. (2000). Dose-Dependent Pharmacokinetics of Cyclosporin a in Rats: Events in Tissues. *Drug Metabolism and Disposition*, 28(5), 582-589.
56. Poulin, P. and Theil, F. P. (2002). Prediction of Pharmacokinetics Prior to in Vivo Studies. 1. Mechanism-Based Prediction of Volume of Distribution. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(1), 129-156.
57. Kostewicz, E. S., Aarons, L., Bergstrand, M., Bolger, M. B., Galetin, A., Hatley, O., Jamei, M., Lloyd, R., Pepin, X., Rostami-Hodjegan, A., Sjogren, E., Tannergren, C., Turner, D. B., Wagner, C., Weitschies, W. and Dressman, J. (2014). Pbpk Models for the Prediction of in Vivo Performance of Oral Dosage Forms. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 57 300-321.
58. Bouzom, F., Ball, K., Perdaems, N. and Walther, B. (2012). Physiologically Based Pharmacokinetic (Pbpk) Modelling Tools: How to Fit with Our Needs? *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, 33(2), 55-71.
59. Nestorov, I. (2007). Whole-Body Physiologically Based Pharmacokinetic Models. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 3(2), 235-249.
60. Willmann, S., Schmitt, W., Keldenich, J. and Dressman, J. B. (2003). A Physiologic Model for Simulating Gastrointestinal Flow and Drug Absorption in Rats. *Pharmaceutical Research*, 20(11), 1766-1771.

61. Willmann, S., Schmitt, W., Keldenich, J., Lippert, J. and Dressman, J. B. (2004). A Physiological Model for the Estimation of the Fraction Dose Absorbed in Humans. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(16), 4022-4031.
62. Yu, L. X. (1999). An Integrated Model for Determining Causes of Poor Oral Drug Absorption. *Pharmaceutical Research*, 16(12), 1883-1887.
63. Watanabe, T., Kusuhara, H., Maeda, K., Shitara, Y. and Sugiyama, Y. (2009). Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling to Predict Transporter-Mediated Clearance and Distribution of Pravastatin in Humans. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 328(2), 652-662.
64. Rodgers, T. and Rowland, M. (2007). Mechanistic Approaches to Volume of Distribution Predictions: Understanding the Processes. *Pharmaceutical Research*, 24(5), 918-933.
65. Luttringer, O., Theil, F. P., Poulin, P., Schmitt-Hoffmann, A. H., Guentert, T. W. and Lave, T. (2003). Physiologically Based Pharmacokinetic (Pbpbk) Modeling of Disposition of Epiroprim in Humans. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92(10), 1990-2007.
66. Rodgers, T., Leahy, D. and Rowland, M. (2005). Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling 1: Predicting the Tissue Distribution of Moderate-to-Strong Bases. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(6), 1259-1276.
67. Rodgers, T. and Rowland, M. (2006). Physiologically Based Pharmacokinetic Modelling 2: Predicting the Tissue Distribution of Acids, Very Weak Bases, Neutrals and Zwitterions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95(6), 1238-1257.
68. Von Kleist, M. and Huisinga, W. (2007). Physiologically Based Pharmacokinetic Modelling: A Sub-Compartmentalized Model of Tissue Distribution. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 34(6), 789-806.
69. Chenel, M., Bouzom, F., Aarons, L. and Ogungbenro, K. (2008). Drug-Drug Interaction Predictions with Pbpbk Models and Optimal Multiresponse Sampling Time Designs: Application to Midazolam and a Phase I Compound. Part 1: Comparison of Uniresponse and Multiresponse Designs Using Popdes. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 35(6), 635-659.
70. Chenel, M., Bouzom, F., Cazade, F., Ogungbenro, K., Aarons, L. and Mentre, F. (2008). Drug-Drug Interaction Predictions with Pbpbk Models and Optimal Multiresponse Sampling Time Designs: Application to Midazolam and a Phase I Compound. Part 2: Clinical Trial Results. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 35(6), 661-681.
71. Kato, M., Shitara, Y., Sato, H., Yoshisue, K., Hirano, M., Ikeda, T. and Sugiyama, Y. (2008). The Quantitative Prediction of Cyp-Mediated Drug Interaction by Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling. *Pharmaceutical Research*, 25(8), 1891-1901.
72. Poirier, A., Funk, C., Lave, T. and Noe, J. (2007). New Strategies to Address Drug-Drug Interactions Involving Oatps. *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, 10(1), 74-83.

73. Vossen, M., Sevestre, M., Niederalt, C., Jang, I. J., Willmann, S. and Edginton, A. N. (2007). Dynamically Simulating the Interaction of Midazolam and the Cyp3a4 Inhibitor Itraconazole Using Individual Coupled Whole-Body Physiologically-Based Pharmacokinetic (Wb-Pbpbk) Models. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 4-13.
74. Jiang, W., Kim, S., Zhang, X., Lionberger, R. A., Davit, B. M., Conner, D. P. and Yu, L. X. (2011). The Role of Predictive Biopharmaceutical Modeling and Simulation in Drug Development and Regulatory Evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 418(2), 151-160.
75. Lionberger, R. A. (2008). FDA Critical Path Initiatives: Opportunities for Generic Drug Development. *The AAPS Journal*, 10(1), 103-109.
76. Emami, J. (2006). In Vitro - in Vivo Correlation: From Theory to Applications. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques*, 9(2), 169-189.
77. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). (1997). *Guidance for Industry Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation, and Application of in Vitro/in Vivo Correlations*. 1-24.
78. Stefanic, M., Locatelli, I., Vrečer, F., Sever, T., Mrhar, A. and Bogataj, M. (2012). The Influence of Gastric Emptying Kinetics on the Drug Release from Enteric Coated Pellets in Fasted State: An in Vitro/in Vivo Correlation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 82(2), 376-382.
79. Cardot, J. M. and Davit, B. M. (2012). In Vitro-in Vivo Correlations: Tricks and Traps. *The AAPS Journal*, 14(3), 491-499.
80. Cardot, J. M. and Beyssac, E. (1993). In Vitro/in Vivo Correlations: Scientific Implications and Standardisation. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 18(1), 113-120.
81. Souliman, S., Blanquet, S., Beyssac, E. and Cardot, J. M. (2006). A Level a in Vitro/in Vivo Correlation in Fasted and Fed States Using Different Methods: Applied to Solid Immediate Release Oral Dosage Form. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(1), 72-79.
82. Eddington, N. D., Marroum, P., Uppoor, R., Hussain, A. and Augsburger, L. (1998). Development and Internal Validation of an in Vitro-in Vivo Correlation for a Hydrophilic Metoprolol Tartrate Extended Release Tablet Formulation. *Pharmaceutical Research*, 15(3), 466-473.
83. Yu, L. X. and Amidon, G. L. (1999). A Compartmental Absorption and Transit Model for Estimating Oral Drug Absorption. *International Journal of Pharmaceutics*, 186(2), 119-125.

84. Wei, H., Dalton, C., Di Maso, M., Kanfer, I. and Lobenberg, R. (2008). Physicochemical Characterization of Five Glyburide Powders: A Bcs Based Approach to Predict Oral Absorption. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 69(3), 1046-1056.
85. Agoram, B., Woltosz, W. S. and Bolger, M. B. (2001). Predicting the Impact of Physiological and Biochemical Processes on Oral Drug Bioavailability. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50 Suppl 1 S41-67.
86. Parrott, N., Lukacova, V., Fraczkiwicz, G. and Bolger, M. B. (2009). Predicting Pharmacokinetics of Drugs Using Physiologically Based Modeling--Application to Food Effects. *The AAPS Journal*, 11(1), 45-53.
87. SimulationsPlus (2013). *Gastroplus™ 8.5 Manual*. Lancaster: SimulationsPlus Inc.,
88. Lu, A. T., Frisella, M. E. and Johnson, K. C. (1993). Dissolution Modeling: Factors Affecting the Dissolution Rates of Polydisperse Powders. *Pharmaceutical Research*, 10(9), 1308-1314.
89. Wang, J. and Flanagan, D. R. (1999). General Solution for Diffusion-Controlled Dissolution of Spherical Particles. 1. Theory. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88(7), 731-738.
90. Takano, R., Furumoto, K., Shiraki, K., Takata, N., Hayashi, Y., Aso, Y. and Yamashita, S. (2008). Rate-Limiting Steps of Oral Absorption for Poorly Water-Soluble Drugs in Dogs; Prediction from a Miniscale Dissolution Test and a Physiologically-Based Computer Simulation. *Pharmaceutical Research*, 25(10), 2334-2344.
91. Pade, V. and Stavchansky, S. (1997). Estimation of the Relative Contribution of the Transcellular and Paracellular Pathway to the Transport of Passively Absorbed Drugs in the Caco-2 Cell Culture Model. *Pharmaceutical Research*, 14(9), 1210-1215.
92. Ungell, A. L., Nylander, S., Bergstrand, S., Sjoberg, A. and Lennernas, H. (1998). Membrane Transport of Drugs in Different Regions of the Intestinal Tract of the Rat. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87(3), 360-366.
93. Adson, A., Burton, P. S., Raub, T. J., Barsuhn, C. L., Audus, K. L. and Ho, N. F. (1995). Passive Diffusion of Weak Organic Electrolytes across Caco-2 Cell Monolayers: Uncoupling the Contributions of Hydrodynamic, Transcellular, and Paracellular Barriers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 84(10), 1197-1204.
94. Saibi, Y., Sato, H. and Tachiki, H. (2012). Developing in Vitro-in Vivo Correlation of Risperidone Immediate Release Tablet. *AAPS Pharmaceutical Scientific Technology*, 13(3), 890-895.
95. Honorio Tda, S., Pinto, E. C., Rocha, H. V., Esteves, V. S., dos Santos, T. C., Castro, H. C., Rodrigues, C. R., de Sousa, V. P. and Cabral, L. M. (2013). In Vitro-in Vivo Correlation of Efavirenz Tablets Using Gastroplus™. *AAPS Pharmaceutical Scientific Technology*, 14(3), 1244-1254.

96. Grbic, S., Parojcic, J., Ibric, S. and Djuric, Z. (2011). In Vitro-in Vivo Correlation for Gliclazide Immediate-Release Tablets Based on Mechanistic Absorption Simulation. *AAPS Pharmaceutical Scientific Technology*, 12(1), 165-171.
97. Internet: Zetia (Ezetimibe Tablets) Drug Information. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.rxlist.com%2Fzetia-drug.htm&date=2015-01-11>, Son Erişim Tarihi: 2015-01-11.
98. Sistla, R., Tata, V. S., Kashyap, Y. V., Chandrasekar, D. and Diwan, P. V. (2005). Development and Validation of a Reversed-Phase Hplc Method for the Determination of Ezetimibe in Pharmaceutical Dosage Forms. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 39(3-4), 517-522.
99. Dixit, R. P., Barhate, C. R., Padhye, S. G., Viswanathan, C. L. and Nagarsenker, M. S. (2010). Stability Indicating Rp-Hplc Method for Simultaneous Determination of Simvastatin and Ezetimibe from Tablet Dosage Form. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 72(2), 204-210.
100. Patel, A., Macwana, C., Parmar, V. and Patel, S. (2012). Simultaneous Determination of Atorvastatin Calcium, Ezetimibe, and Fenofibrate in a Tablet Formulation by Hplc. *Journal of AOAC International*, 95(2), 419-423.
101. Singh, S., Singh, B., Bahuguna, R., Wadhwa, L. and Saxena, R. (2006). Stress Degradation Studies on Ezetimibe and Development of a Validated Stability-Indicating Hplc Assay. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41(3), 1037-1040.
102. Taupitz, T., Dressman, J. B. and Klein, S. (2013). New Formulation Approaches to Improve Solubility and Drug Release from Fixed Dose Combinations: Case Examples Pioglitazone/Glimepiride and Ezetimibe/Simvastatin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 84(1), 208-218.
103. Patel, A. Y., Pillarisetti, J., Marr, J. and Vacek, J. L. (2013). Ezetimibe in Combination with a Statin Does Not Reduce All-Cause Mortality. *Journal of Clinical Medicine Research*, 5(4), 275-280.
104. Patel, J., Sheehan, V. and Gurk-Turner, C. (2003). Ezetimibe (Zetia): A New Type of Lipid-Lowering Agent. *Proceedings*, 16(3), 354-358.
105. Gouni-Berthold, I., Berthold, H. K., Gylling, H., Hallikainen, M., Giannakidou, E., Stier, S., Ko, Y., Patel, D., Soutar, A. K., Seedorf, U., Mantzoros, C. S., Plat, J. and Krone, W. (2008). Effects of Ezetimibe and/or Simvastatin on Ldl Receptor Protein Expression and on Ldl Receptor and Hmg-CoA Reductase Gene Expression: A Randomized Trial in Healthy Men. *Atherosclerosis*, 198(1), 198-207.
106. Fisher, M. B., Paine, M. F., Strelevitz, T. J. and Wrighton, S. A. (2001). The Role of Hepatic and Extrahepatic Udp-Glucuronosyltransferases in Human Drug Metabolism. *Drug Metabolism Reviews*, 33(3-4), 273-297.
107. Ghosal, A., Hapangama, N., Yuan, Y., Achanfuo-Yeboah, J., Iannucci, R., Chowdhury, S., Alton, K., Patrick, J. E. and Zbaida, S. (2004). Identification of Human Udp-

Glucuronosyltransferase Enzyme(S) Responsible for the Glucuronidation of Ezetimibe (Zetia). *Drug Metabolism and Disposition*, 32(3), 314-320.

108. Vertzoni, M., Fotaki, N., Kostewicz, E., Stippler, E., Leuner, C., Nicolaidis, E., Dressman, J. and Reppas, C. (2004). Dissolution Media Simulating the Intraluminal Composition of the Small Intestine: Physiological Issues and Practical Aspects. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56(4), 453-462.
109. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. (2005). *Ich Harmonised Tripartite Guideline on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (Q2) R1*.
110. Ezzet, F., Krishna, G., Wexler, D. B., Statkevich, P., Kosoglou, T. and Batra, V. K. (2001). A Population Pharmacokinetic Model That Describes Multiple Peaks Due to Enterohepatic Recirculation of Ezetimibe. *Clinical therapeutics*, 23(6), 871-885.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : BAYKA, Çiğdem
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 14/06/1985 Ankara
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0 (288) 427 13 71
 Faks : 0 (288) 427 14 59
 e-posta : cbayka@gmail.com



Eğitim Derecesi

Okul/Program

Mezuniyet Yılı

Yüksek Lisans

Gazi Üniversitesi
 Endüstriyel Eczacılık Bölümü

Devam ediyor

Yüksek Lisans

Joseph Fourier Üniversitesi
 Biyoloji Bölümü

2007

Lisans

ODTÜ
 Kimya Mühendisliği

2006

Lise

TED Ankara Koleji

2002

İş Deneyimi, Yıl

Çalıştığı Yer

Görev

2008-devam ediyor

Zentiva Sağlık Ürünleri

Formülasyon Geliştirme
 Uzmanı

Yabancı Diller

İngilizce, Fransızca

Yurtdışında katılan kurslar:

GastroPlus™ Eğitimi, 16-17 Nisan 2013, Dr. Michael Bolger, Sanofi Paris

GastroPlus™ Eğitimi, Ağustos-Eylül 2014, Dr. Xavier Pepin, Sanofi Paris

Uluslararası Tebliğ

Bayka C, Oran U, Adıyaman M, Teksin ZŞ “Biorelevant Dissolution Studies of Ezetimibe, a BCS Class II Drug, International Multidisciplinary Symposium on Drug Research & Development, Antalya, Turkey, **November 28-30, 2013.**

INTERNATIONAL MULTIDISCIPLINARY SYMPOSIUM ON DRUG RESEARCH & DEVELOPMENT

Organized by

Faculties of Pharmacy in Turkey

&

Society of Researchers in Pharmacy and Medicine

www.ilarud.org



ABSTRACTS BOOK

Kervansaray Hotel
Lara ANTALYA-TURKEY
28-30 November 2013



2013 Meeting Committee

Gazi University, Faculty of Pharmacy

&

Society of Researchers in Pharmacy and Medicine

Supported by



BIORELEVANT DISSOLUTION STUDIES OF EZETIMIBE, A BCS CLASS II DRUG

Çiğdem BAYKA^{1,2}, Umut ORAN², Mustafa ADIYAMAN², Zeynep Şafak TEKSİN^{3,*}

¹Gazi University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Industrial Pharmacy Programme, 06330 Ankara, Türkiye

²Zentiva Health Care Products, Development Department, 39780 Kırklareli, Türkiye

³Gazi University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, 06330 Ankara, Türkiye
*(zsteksın@gazi.edu.tr)

Dissolution testing is a powerful tool to measure product performance. It is used to guide formulation, monitor the manufacturing process, assess product quality and in some cases predict in vivo performance of solid dosage forms. Compendial dissolution media only reflect the pH of the different sections of the GI tract, whereas, biorelevant media mimic intestinal fluids and result in more accurate simulation of the human GI tract as they contain natural surfactants (bile salts and lecithin) and provide buffer capacity and osmolarity. Biorelevant media have been used to examine the solubility and dissolution characteristics of several classes of drugs including poorly soluble weak bases and lipophilic drugs to assist in predicting in vivo absorption behavior¹.

Ezetimibe is the first lipid-lowering drug that inhibits intestinal uptake of dietary and biliary cholesterol without affecting the absorption of fat-soluble nutrients. It is a lipophilic drug and classified as BCS Class II due to its very low solubility. The absolute bioavailability of ezetimibe has not been determined since it is virtually insoluble in aqueous media suitable for intravenous injection. It is rapidly absorbed and extensively metabolized to the pharmacologically active ezetimibe-glucuronide².

The aim of this study was to compare dissolution behaviors of innovator and generic ezetimibe products, Ezetrol® 10 mg tablets by MSD and Ezetimibe 10 mg tablets by Zentiva, respectively, in compendial dissolution media which contain SLS and biorelevant media. 0.45% SLS, as suggested by FDA³, was added to compendial media (pH 2.8, pH 4.5 and pH 6.8) and SIF® Powder, a lyophilized powder mix including sodium taurocholate and lecithin, was used to prepare FaSSIF (Fasted State Simulated Intestinal Fluid) and FeSSIF (Fed State Simulated Intestinal Fluid) media.

A HPLC dissolution method was developed and validated with linearity, accuracy, precision, repeat-

ability, stability in solution parameters for the dissolution media. Dissolution tests were carried out at 37 ± 0.5°C in 500 mL dissolution media at 50 rpm by USP 2 Paddle Apparatus. Samples were taken at 5, 10, 15, 20, 30, 45 and 60 min time intervals, filtered through 0.45 µm PET filters (Macherey-Nagel Chromafil PRT-45/25 Polyester) and analyzed by a HPLC system with a UV detector at 230 nm.

It was observed that in classical media which contain 0.45 % SLS, dissolution profiles of both innovator and generic products were similar and since at least 85% dissolution was achieved in 15 minutes, f_2 calculation was not necessary. Moreover, there was no meaningful discrimination between dissolution behavior in different pHs for both the innovator and the generic products. On the other hand, in biorelevant media, even though the innovator and the generic products gave similar dissolution curves with $f_2=87$ for FaSSIF and $f_2=57$ for FeSSIF, dissolution rates were much slower. Dissolution values reached ~40% in FaSSIF and ~70% in FeSSIF, in 15 minutes, for both products. This phenomenon can be related to the amounts and solubility powers of synthetic and natural surfactants found in the media. SLS, being a powerful surfactant and present in a high concentration probably causes an overestimation of the dissolution amount ezetimibe in classical media compared to FaSSIF and FeSSIF media.

- [1] Maques M. Dissolution Media Simulating Fasted and Fed States. *Dissolution Technologies*. May 2004,16.
- [2] Kosoglou T, Statkevich P, Johnson-Levonos AO, Paolini JF, Bergman AJ, Alton KB Ezetimibe: A review of its metabolism, pharmacokinetics and drug interactions. *Clinical Pharmacokinetics*. 44(5), 467-94, 2005.
- [3] FDA Dissolution Data Base <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/index.cfm>



GAZİ GELECEKTİR...