

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Ivana A. Kocić

**BIOFARMACEUTSKA  
KARAKTERIZACIJA TABLETA SA  
TRENUTNIM OSLOBAĐANJEM  
LEVOTIROKSIN-NATRIJUMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Ivana A. Kocić

**BIOPHARMACEUTICAL  
CHARACTERIZATION OF  
LEVOTHYROXINE SODIUM IMMEDIATE-  
RELEASE TABLETS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmakokinetiku i kliničku farmaciju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta. Deo istraživanja je sproveden na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta i u Galenici a.d.

## MENTORI

---

Dr Branislava Miljković, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Dr Jelena Parojčić, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

## ČLAN KOMISIJE

---

dr Irena Homšek, naučni saradnik  
Galenika a.d., Beograd

Datum odbrane \_\_\_\_\_

## ZAHVALNICA

Želela bih da izrazim najtopliju zahvalnost i poštovanje svom mentoru prof. dr Branislavi Miljković na izboru teme disertacije, posvećenom vremenu, ukazanom poverenju i pomoći koju mi je pružila u toku rada na ovoj doktorskoj disertaciji, kao i na divnoj saradnji i razumevanju.

Mentoru prof. dr Jeleni Parojčić takođe dugujem neizmernu zahvalnost na velikoj stručnoj pomoći, ohrabrenjima, korisnim diskusijama i saradnji prilikom izrade ove disertacije.

Dr Ireni Homšek najiskrenije zahvaljujem na razumevanju, korisnim sugestijama i prijateljskim savetima u brojnim trenucima kada je to bilo potrebno i na podršci koju mi i danas pruža.

Zahvaljujem se dr Mirjani Dačević na pomoći u realizaciji dela eksperimentalnog rada vezanog za studiju bioekvivalencije.

Doc. dr Katarini Vučićević zahvaljujem na izuzetnoj predusretljivosti i stručnoj pomoći pri analizi dela eksperimentalnih rezultata studije bioekvivalencije.

Posebnu zahvalnost dugujem doc. dr Sandri Grbić na prijateljskoj podršci i ogromnoj pomoći tokom eksperimentalnog dela rada vezanog za *in silico* studiju i na pomoći pri tumačenju rezultata.

Neizmernu zahvalnost dugujem svom ocu, koji bi, verujem, bio veoma ponosan na mene. Najveću i najiskreniju zahvalnost dugujem majci, sestri i Marinku na bezuslovnoj podršci, razumevanju i ljubavi koju mi pružaju i koji daju smisao svemu što radim u životu. Bez njih, danas ne bih bila to što jesam.

## BIOFARMACEUTSKA KARAKTERIZACIJA TABLETA SA TRENUTNIM OSLOBADANJEM LEVOTIROKSIN-NATRIJUMA

### Rezime

Nakon oralne primene, koja za pacijente često predstavlja najprihvatljiviji put uzimanja lekovitog preparata, lek je izložen mnogobrojnim fizičkim, hemijskim i biološkim promenama koje definišu njegovu sudbinu u organizmu. Koncept biološke raspoloživosti i biološke ekvivalencije je upravo i razvijen sa ciljem da objasni i kvantifikuje ove promene. Bioekvivalencija lekova postoji u slučajevima kada su dva preparata farmaceutski ekvivalentna i kada je njihova bioraspoloživost, nakon primene u istom molarnom odnosu, slična u tolikoj meri da će njihovo dejstvo u organizmu, uzimajući u obzir efikasnost i neškodljivost, biti isto. Sa uvođenjem Biofarmaceutskog sistema klasifikacije lekova, koji se bazira na pretpostavci da su rastvorljivost, brzina rastvaranja i permeabilnost ključni faktori koji utiču na resorpciju leka, omogućeno je korišćenje testa brzine rastvaranja kao zamene za *in vivo* ispitivanje bioekvivalencije (*biowaiver* koncept). Kako je resorpcija leka veoma kompleksan proces, koji se često teško može kvantifikovati konvencionalnom farmakokinetičkom analizom, poslednjih godina je došlo do razvoja većeg broja *in silico* modela koji na osnovu kombinacije odgovarajućih farmakokinetičkih, fizičko-hemijskih i fizioloških parametara omogućavaju predviđanje ovog procesa.

Cilj ovog rada je bila biofarmaceutska karakterizacija razvojne formulacije tableta sa trenutnim oslobađanjem levotiroksin-natrijuma i razvoj biorelevantnog testa za ispitivanje brzine rastvaranja kroz izvođenje odgovarajućih *in vivo*, *in vitro* i *in silico* studija.

U okviru *in vitro* ispitivanja je sprovedena karakterizacija levotiroksin-natrijuma u pogledu rastvorljivosti i brzine rastvaranja iz tableta pri različitim eksperimentalnim uslovima. U okviru *in vivo* studije je sprovedeno ispitivanje biološke ekvivalentnosti izabranih preparata u grupi zdravih ispitanika oba pola, u vidu randomizovane, dvostruko ukrštene studije, nakon primene odgovarajuće doze leka. Određivanje farmakokinetičkih parametara je vršeno sa korekcijom i bez korekcije koncentracije levotiroksina u odnosu na endogeni nivo. Za *in silico* predviđanje resorpcije levotiroksina korišćena je metoda gastrointestinalne simulacije u okviru *GastroPlus*<sup>TM</sup>

softvera. Kao ulazni parametri potrebni za simulaciju korišćeni su literaturni podaci, *in silico* predviđene i/ili eksperimentalno dobijene vrednosti. Simulirani profil resorpcije upoređen je sa profilom referentnog preparata dobijenim u *in vivo* studiji. Razvijeni model je iskorišćen za ispitivanje uticaja različitih brzina rastvaranja lekovite supstance iz preparata na sudbinu leka u organizmu, kao i za utvrđivanje biorelevantne specifikacije brzine rastvaranja na osnovu seta virtuelnih *in vitro* profila. Nivo korelacije između predviđenih profila i profila dobijenog u studiji bioekvivalencije utvrđen je primenom linearne regresione analize.

Rezultati ispitivanja rastvorljivosti pokazuju da se rastvorljivost levotiroksin-natrijuma smanjuje sa povećanjem pH vrednosti medijuma, dostiže minimalnu vrednost pri pH 4-5 i zatim opet raste sa daljim povećanjem pH vrednosti. Ispitivanjem brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz tableta je uočeno brzo i kompletno oslobađanje lekovite supstance pri većini primenjenih eksperimentalnih uslova. Rezultati sprovedene *in vivo* studije su pokazali sličnost između farmakokinetičkih profila ispitivanih preparata bez korekcije i sa korekcijom koncentracije levotiroksina u odnosu na endogeni nivo. Utvrđeno je da korekcija koncentracije obezbeđuje veći stepen pouzdanosti pri proceni bioekvivalencije, jer relativno visok endogeni nivo maskira razlike između ispitivanih preparata. Rezultati *in silico* modelovanja su pokazali da se tehnologija gastrointestinalne simulacije može uspešno koristiti za predviđanje resorpcije levotiroksina. Kombinacijom *in vitro* i *in silico* pristupa utvrđeno je da se zahtev za brzinu rastvaranja od najmanje 85% levotiroksina oslobođenog za 60 minuta može smatrati biorelevantnim. Rezultati *in silico* simulacija u kombinaciji sa *in vitro-in vivo* korelacijom su iskorišćeni za kritičku analizu mogućnosti primene *biowaiver* koncepta u slučaju levotiroksin-natrijum tableta sa trenutnim oslobađanjem. Da bi ovaj pristup bio prihvaćen od strane regulatornih tela, neophodna su dalja istraživanja u ovoj oblasti.

**Ključne reči:** levotiroksin, bioekvivalentnost, biofarmaceutska karakterizacija, *in vitro-in vivo* korelacija

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Farmakokinetika i klinička farmacija

**UDK broj:** 615.015.4 : 615.25 (043.3)

615.011 : 615.25 (043.3)

## BIOPHARMACEUTICAL CHARACTERIZATION OF LEVOTHYROXINE SODIUM IMMEDIATE-RELEASE TABLETS

### Abstract

The oral route of drug administration is the most convenient and, for patients, the most acceptable method for administering drugs intended to have systemic effects. After oral administration, drugs are exposed to many physical, chemical and biological alterations, which define their *in vivo* performance. The concept of bioavailability and bioequivalence has been developed in order to describe and quantify these alterations. Bioequivalence is a comparison of the bioavailability of two or more drug products. Thus, two products or formulations containing the same active ingredient are bioequivalent if their rates and extents of absorption are the same. Utilisation of *in vitro* dissolution tests as a surrogate for *in vivo* bioequivalence studies (*biowaiver*) was introduced with the Biopharmaceutics classification system, based on the assumption that drug solubility, permeability and dissolution rate from the dosage form are critical factors influencing the rate and extent of oral drug absorption. Oral drug absorption is complex process which cannot be always easily evaluated by the conventional pharmacokinetic analysis. Therefore, the *in silico* prediction tools capable of predicting *in vivo* drug absorption on the basis of drug physicochemical and pharmacokinetic properties have been developed recently.

The aim of this research was biopharmaceutical characterization of the levothyroxine sodium immediate-release tablets based on the results of *in vivo*, *in vitro* and *in silico* studies.

The *in vitro* study included determination of levothyroxine sodium solubility and evaluation of effect of various experimental conditions on levothyroxine sodium release from immediate-release tablets. The *in vivo* study was conducted as randomized, single dose, two-way cross-over bioequivalence study in healthy subjects. Pharmacokinetic parameters were calculated without and with adjustment for baseline levels of endogenous levothyroxine. The drug-specific absorption model for levothyroxine was developed using mechanistic gastrointestinal simulation technology implemented in *GastroPlus*<sup>TM</sup> software package. The required input parameters were experimentally determined, *in silico* predicted and/or taken from the literature. The profile obtained was

compared with the mean levothyroxine plasma concentration-time profile observed *in vivo* for the reference formulation. Additionally, plasma concentration-time profiles were simulated based on a set of experimental and virtual *in vitro* dissolution data in order to estimate the influence of different *in vitro* drug dissolution kinetics on the simulated plasma profiles and to identify biorelevant dissolution specification. A set of experimental and virtual *in vitro* data was also used for correlation purposes. Linear regression analysis was used to evaluate the obtained correlation plots.

The equilibrium drug solubility data indicated that levothyroxine sodium solubility decreases with an increase in pH, goes through a minimum at around pH 4-5, and increases again with further increase in pH. The results of dissolution studies indicated rapid and complete drug dissolution under the majority of experimental conditions studied. The results of the *in vivo* study suggest that the test product was bioequivalent to the reference product, which is supported by the analysis of concentration-time profiles without and with baseline correction. The use of the correction method is shown to be more sensitive because the relatively high endogenous drug level resulted in masking of the relative difference between the drug products. The results of the *in silico* study demonstrated that gastrointestinal simulation technology can be successfully used to predict levothyroxine absorption profile. Based on the results obtained by *in vitro-in vivo* correlation in conjunction with gastrointestinal simulation technology, dissolution specification of more than 85% of levothyroxine dissolved in 60 minutes could be suggested as biorelevant dissolution acceptance criteria for immediate-release tablets. The proposed methodology involving gastrointestinal simulation technology and *in vitro-in vivo* correlation indicated that there might be a rationale for considering biowaiver extension for levothyroxine sodium tablets, but the implementation of this concept needs further evaluation.

**Keywords:** levothyroxine, bioequivalence, biopharmaceutical characterization, *in vitro-in vivo* correlation

**Scientific field:** Pharmacy

**Specific scientific field:** Pharmacokinetics and clinical pharmacy

**UDC number:** 615.015.4 : 615.25 (043.3)

615.011 : 615.25 (043.3)



## Sadržaj

OPŠTI DEO .....	1
1 LEVOTIROKSIN .....	2
1.1 Tireoidni hormoni .....	2
1.1.1 Sinteza, skladištenje i sekrecija .....	2
1.1.2 Mehanizam delovanja .....	5
1.1.3 Poremećaji funkcije tireoidne žlezde .....	5
1.1.4 Terapija hipotireoidizma .....	5
1.2 Opšte karakteristike levotiroksina .....	6
1.2.1 Fizičko-hemijske i biofarmaceutske osobine .....	7
1.2.2 Farmakokinetički podaci .....	8
1.2.3 Klinička bezbednost i toksikološki podaci .....	10
1.2.4 Biološka ekvivalentnost tableta levotiroksina .....	11
1.2.4.1 Korekcija ukupnog nivoa levotiroksina u odnosu na endogeni nivo .....	12
1.2.4.2 Doza u studiji bioekvivalencije .....	12
1.2.4.3 Levotiroksin kao lek uske terapijske širine .....	13
2 BIOFARMACEUTSKA KARAKTERIZACIJA LEKOVA .....	14
2.1 Biološka raspoloživost i biološka ekvivalentnost lekova .....	14
2.1.1 Faktori koji utiču na biološku raspoloživost .....	16
2.1.2 Studije biološke ekvivalentnosti .....	17
2.2 Biofarmaceutski sistem klasifikacije lekova .....	22
2.2.1 Kriterijumi za biofarmaceutsku klasifikaciju lekovitih supstanci .....	24
2.2.1.1 Rastvorljivost .....	24
2.2.1.2 Permeabilnost .....	26
2.2.1.3 Brzina rastvaranja lekovite supstance iz lekovitog preparata .....	27
2.2.2 Primena Biofarmaceutskog sistema klasifikacije lekova: <i>biowaiver</i> .....	30
3 <i>IN SILICO</i> MODELI ZA PREDVIĐANJE RESORPCIJE .....	34
3.1 Prostorni resorpcioni modeli .....	34
3.1.1 Prostorni model resorpcije i tranzita .....	35
3.1.2 Unapređeni prostorni model resorpcije i tranzita .....	36
3.2 <i>In vitro-in vivo</i> korelacija .....	38
3.2.1 <i>In vitro-in vivo</i> korelacija nivoa A .....	39

3.2.2 Primena <i>in vitro-in vivo</i> korelacije .....	41
CILJ RADA .....	43
EKSPERIMENTALNI DEO .....	44
4 MATERIJALI I METODE .....	45
4.1 <i>IN VITRO</i> ISPITIVANJE .....	45
4.1.1 Materijali .....	45
4.1.1.1 Uzorci tableta .....	45
4.1.1.2 Medijumi za ispitivanje rastvorljivosti i brzine rastvaranja .....	46
4.1.2 Metode .....	47
4.1.2.1 Ispitivanje rastvorljivosti .....	47
4.1.2.2 Ispitivanje variranja mase tableta .....	48
4.1.2.3 Ispitivanje raspadljivosti tableta .....	48
4.1.2.4 Ispitivanje čvrstine tableta .....	48
4.1.2.5 Određivanje sadržaja levotiroksin-natrijuma u tabletama .....	49
4.1.2.6 Ispitivanje brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz tableta .....	49
4.1.2.7 Poređenje profila brzine rastvaranja .....	51
4.2 <i>IN VIVO</i> ISPITIVANJE .....	51
4.2.1 Protokol ispitivanja .....	51
4.2.1.1 Dizajn studije .....	52
4.2.1.2 Karakteristike ispitanika .....	52
4.2.1.3 Randomizacija .....	53
4.2.1.4 Ispitivani preparati .....	53
4.2.1.5 Uzimanje uzoraka za analizu .....	53
4.2.1.6 Kvantitativna analiza levotiroksina u uzorcima krvi .....	54
4.2.1.7 Farmakokinetička i statistička analiza .....	54
4.3 <i>IN SILICO</i> ISPITIVANJE .....	55
5 REZULTATI I DISKUSIJA .....	57
5.1 <i>IN VITRO</i> ISPITIVANJE .....	57
5.1.1 Rastvorljivost levotiroksin-natrijuma .....	57
5.1.2 Karakteristike ispitivanih preparata .....	60
5.1.3 Brzina rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz tableta .....	60

5.1.3.1 Uticaj pH vrednosti medijuma na brzinu rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz tableta .....	67
5.1.3.2 Uticaj intenziteta mešanja na brzinu rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz tableta .....	72
5.1.3.3 Ispitivanje brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz zbirnog uzorka tableta .....	77
5.1.3.4 Uporedno ispitivanje brzine rastvaranja u skladu sa regulatornim zahtevima za <i>biowaiver</i> .....	81
5.2 <i>IN VIVO</i> ISPITIVANJE.....	92
5.3 <i>IN SILICO</i> ISPITIVANJE .....	113
5.3.1 Gastrointestinalna simulacija-razvoj modela .....	113
5.3.2 Predviđanje resorpcije levotiroksina .....	119
5.3.3 Uticaj brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz tableta na resorpciju leka .	124
5.3.4 <i>In vitro-in vivo</i> korelacije .....	129
5.3.4.1 Višestruka korelacija nivoa C.....	129
5.3.4.2 Korelacija nivoa A.....	132
5.3.5 Simulacija resorpcije levotiroksina u prisustvu hrane.....	134
5.3.6 Virtuelna studija .....	136
5.3.7 Mogućnost primene <i>biowaiver</i> koncepta.....	141
ZAKLJUČAK.....	144
LITERATURA.....	149

## Lista skraćenica

a	nagib pravca
ACAT	unapređeni prostorni model resorpcije i tranzita ( <i>Advanced Compartmental Absorption and Transit Model</i> )
An	resorpcioni broj ( <i>Absorption Number</i> )
ANOVA	analiza varijanse
ASF	faktor koji definiše brzinu resorpcije leka u određenom prostoru gastrointestinalnog trakta ( <i>Absorption Scale Factor</i> )
BCS	Biofarmaceutski sistem klasifikacije lekova ( <i>Biopharmaceutics Classification System</i> )
C1	koeficijent resorpcionog gradijenta
C2	koeficijent resorpcionog gradijenta
CAT	prostorni model resorpcije i tranzita ( <i>Compartmental Absorption and Transit Model</i> )
CI	interval pouzdanosti ( <i>Confidence interval</i> )
Cl	klirens
C <sub>max</sub>	maksimalna koncentracija leka u plazmi
C <sub>max, ss</sub>	maksimalna koncentracija leka u plazmi u stanju ravnoteže
CR	kontrolisano oslobađanje ( <i>controlled-release</i> )
CV	koeficijent varijacije
C <sub>0</sub>	osnovna rastvorljivost
D <sub>0</sub>	dozni broj ( <i>Dose number</i> )
D <sub>n</sub>	broj brzine rastvaranja ( <i>Dissolution number</i> )
D <sub>m</sub>	membranski difuzitet
EMA	Evropska agencija za lekove ( <i>European Medicines Agency</i> )
F	stepen biološke raspoloživosti
f <sub>2</sub>	faktor sličnosti
FDA	Američka agencija za hranu i lekove ( <i>Food and Drug Administration</i> )
FIP	Međunarodna farmaceutska organizacija ( <i>International Pharmaceutical Federation</i> )
f <sub>u</sub>	slobodna frakcija leka u plazmi ( <i>fraction unbound</i> )
GLP	Dobra laboratorijska praksa ( <i>Good Laboratory Practice</i> )

HBsAg	hepatitis B površinski antigen
HCV	hepatitis C virus
HIV	virus humane imunodeficijencije
HPLC	visoko efikasna tečna hromatografija ( <i>High-performance Liquid Chromatography</i> )
IR	trenutno oslobađanje ( <i>immediate-release</i> )
iv	intravenski
IVIVK	<i>in vitro-in vivo</i> korelacija
$K_a$	konstanta brzine resorpcije
$k_{el}$	konstanta brzine eliminacije
$K_m$	Michaelis-ova konstanta
logP	oktanol/voda particioni koeficijent
$L_m$	debljina membrane
$M_0$	maksimalna terapijska doza lekovite supstance
mp	temperatura topljenja
MAD	maksimalna doza koja se resorbuje
MDCK	kultura ćelija dobijena iz bubrega pasa ( <i>Madin-Darby canine kidney cell culture</i> )
NaLS	natrijum-laurilsulfat
NTI	uzak terapijski indeks ( <i>Narrow Therapeutic Index</i> )
OATP	organski anjonski polipeptidni transporter ( <i>Organic Anion Transporter Polypeptide</i> )
PE	greška predviđanja ( <i>prediction error</i> )
PIK	površina ispod krive koncentracije leka u plazmi u funkciji vremena
$PIK_{0-t}$	parcijalna površina ispod krive koncentracije leka u plazmi u funkciji vremena
$PIK_{0-\infty}$	ukupna površina ispod krive koncentracije leka u plazmi u funkciji vremena
$PIK_{ss}$	površina ispod krive koncentracije leka u plazmi u funkciji vremena u toku jednog intervala doziranja u stanju ravnoteže
pKa	konstanta disocijacije
$P_m$	koeficijent permeabilnosti

PSA	analiza osetljivosti parametara ( <i>Parameter Sensitivity Analysis</i> )
r	koeficijent korelacije
R	referentni preparat
rT3	reverzni trijodotironin
S	rastvorljivost
SD	standardna devijacija ( <i>Standard deviation</i> )
S <sub>f</sub>	entropija
SIWV	zapremina tečnosti u tankom crevu ( <i>Small Intestinal Water Volume</i> )
SITT	vreme prolaza kroz tanko crevo ( <i>Small Intestinal Transit Time</i> )
T	test preparat
t <sub>1/2</sub>	poluvreme eliminacije
t <sub>max</sub>	vreme za koje je postignuta maksimalna koncentracija leka u plazmi
t <sub>max, ss</sub>	vreme za koje je postignuta maksimalna koncentracija leka u plazmi u stanju ravnoteže
T3	trijodotironin
T4	tetrajodotironin (tiroksin)
TSH	tireostimulirajući hormon ( <i>Thyroid Stimulating Hormone</i> )
TRH	tireotropin oslobađajući hormon ( <i>Thyroid Stimulating Hormone</i> )
TBG	tiroksin vezujuću globulin ( <i>Thyroxine Binding Globulin</i> )
TBPA	tiroksin vezujući prealbumin ( <i>Thyroxine Binding Prealbumin</i> )
WHO	Svetska zdravstvena organizacija ( <i>World Health Organization</i> )
USP	Američka farmakopeja ( <i>United States Pharmacopoeia</i> )
V <sub>max</sub>	maksimalna brzina
V <sub>0</sub>	zapremina tečnosti uzeta sa lekom

# OPŠTI DEO

## **1 LEVOTIROKSIN**

Najstariji zapisi o bolestima štitne žlezde potiču od antičkih lekara iz drevnog Rima, koji su povezali pojavu gušavosti kod naroda naseljenih u podnožju Alpa sa vodom koju su koristili za piće, a koja je uzrokovala pojavu otečenog grla, dok se Theophrastus Bombast von Hohenheim, poznat kao Paracelzijus (1493-1541), smatra prvim koji je opisao povezanost gušavosti sa intelektualnim poremećajima kod obolelih osoba [1, 2]. Francuski hemičar Adolphe Chatin (1813-1901) je prvi naučnik koji je pretpostavio da gušavost može biti posledica nedostatka joda u organizmu i da je njen glavni uzrok niska koncentracija joda u vodi za piće u pojedinim oblastima Evrope [3].

### **1.1 Tireoidni hormoni**

Tireoidna žlezda iz folikularnih ćelija koje predstavljaju njene osnovne funkcionalne jedinice luči dva hormona: trijodotironin (T3) i tiroksin ili tetrajodotironin (T4). Svaki folikul tireoidne žlezde se sastoji iz jednog sloja epitelnih ćelija složenih oko lumena folikula, koji je ispunjen gustim koloidom koji sadrži veliki glikoprotein tireoglobulin [4, 5]. Sinteza tireoidnih hormona se odvija jodiranjem tirozinskih ostataka tireoglobulina [4]. Osnovna uloga tireoidnih hormona je regulisanje brzine oksidativnih procesa u svakoj ćeliji organizma i od kritičnog su značaja za normalan rast i razvoj i energetske metabolizam. I tiroksin i trijodotironin pojačavaju metabolizam ugljenih hidrata, masti i proteina i stimulišu kalorigenezu. Tireoidni hormoni imaju odlučujući efekat na rast i razvoj, kako direktnim putem, preko delovanja na nivou ćelija, tako i indirektno, preko regulacije proizvodnje hormona rasta i potenciranja njegovih efekata. Posebno su značajni za normalan razvoj centralnog nervnog sistema, pri čemu imaju osobinu da snažno povećaju osetljivost organizma na kateholamine i pokazuju pozitivno inotropno i hronotropno delovanje na srce [5].

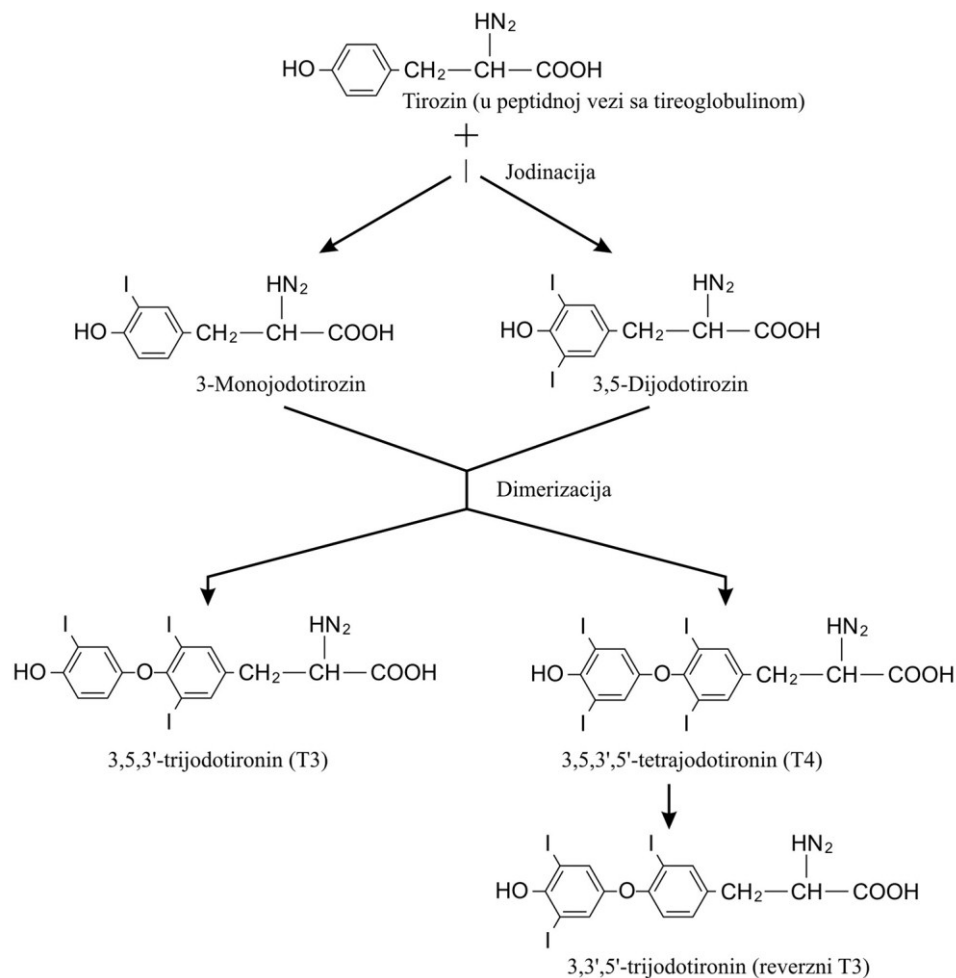
#### **1.1.1 Sinteza, skladištenje i sekrecija**

Glavni koraci u sintezi tireoidnih hormona u organizmu su:



- preuzimanje jodida iz plazme od strane folikularnih ćelija tireoidne žlezde;
- oksidacija jodida u jod pomoću enzima tireoperoksidaze i jodiranje tirozinskih ostataka u tireoglobulinu, pri čemu se prvo formiraju monojodtirozin i dijudtirozin, a zatim, njihovim spajanjem, trijodotironin i tetrajodotironin;
- sekrecija sintetizovanih hormona u cirkulaciju [5].

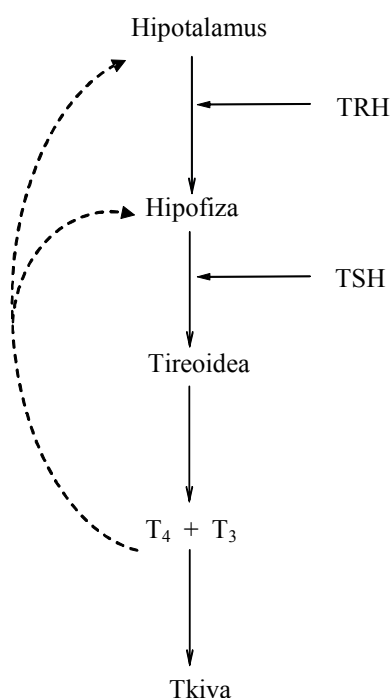
Šematski prikaz sinteze tireoidnih hormona je prikazan na slici 1.



**Slika 1.** Sinteza tireoidnih hormona [5]

Sinteza i sekrecija tiroksina i trijodotironina tireoidne žlezde sa normalnom funkcijom je regulisana kompleksnom povratnom spregom hipotalomusno-hipofizno-tireoidne osovine (slika 2) [4, 5]. Tireotropni hormon (*thyroid stimulating hormone*, TSH) adenohipofize stimuliše tireoidnu žlezdu na sekreciju tireoidnih hormona. Oslobođanje tireotropnog hormona je pod nadzorom hormona koji oslobađa tireotropin (*thyrotropin releasing hormone*, TRH) koji sekretuju nervni završeci hipotalamusa. S

druge strane, hormoni tireoidne žlezde inhibiraju sekreciju TSH i TRH. Stoga, kada se poveća koncentracija tiroksina i trijodotironina u plazmi, dolazi do smanjenog oslobađanja TSH i TRH. Primena egzogenih tireoidnih hormona kod eutireoidnih osoba dovodi do smanjenja sekrecije endogenih tireoidnih hormona. Tireoidna žlezda sekretuje oko 70-90  $\mu\text{g}$  tiroksina i oko 15-30  $\mu\text{g}$  trijodotironina dnevno, pri čemu oko 80% trijodotironina nastaje dejodinacijom tiroksina u perifernim tkivima i samo oko 20% nastaje direktnom sintezom u tireoidnoj žlezdi [4]. Kod zdravih osoba, ukupna koncentracija endogenog tiroksina je 50 do 120 ng/ml [4]. Ukupna koncentracija endogenog trijodotironina je 0.7 do 2 ng/ml kod zdravih osoba [4]. Koncentracija ukupnog reverznog trijodotironina u plazmi je 0.1 do 0.6 ng/ml [4]. Koncentracije tiroksina i trijodotironina u plazmi se neznatno smanjuju starenjem, smanjene su kod fetusa i novorođenčadi i neznatno su povećane kod gojaznih osoba. Koncentracije reverznog trijodotironina u plazmi su povećane kod zdravih osoba preko 70 godina starosti i primetno su povećane kod fetusa i novorođenčadi [4].



**Slika 2.** Hipotalomusno-hipofizno-tireoidna osovina i mehanizam negativne povratne sprege [4]

### **1.1.2 Mehanizam delovanja**

Fiziološko dejstvo tireoidnih hormona se ostvaruje pretežno dejstvom trijodotironina, koji se može smatrati aktivnim hormonom, jer su njegova dejstva 3 do 5 puta jača od tiroksina, a afinitet za receptore je veći za 4 do 10 puta [4, 5]. Mehanizam dejstva tireoidnih hormona se zasniva na vezivanju za specifične receptore: preko receptora na membrani ubrzavaju razmenu jona  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$ , kao i ulazak glukoze i aminokiselina u ćelije, vezivanjem za receptore na mitohondrijama obezbeđuju stvaranje ATP i regulišu bazalni metabolizam i kalorigenezu, a vezivanjem za receptore u jedru preko uticaja na DNK regulišu sintezu mRNK i proteina [5].

### **1.1.3 Poremećaji funkcije tireoidne žlezde**

Poremećaji funkcije tireoidne žlezde uključuju:

- hipertireoidizam (tireotoksikozu), u obliku difuzne toksične strume ili nodularne strume, pri čemu se javlja prekomerna aktivnost tireoidnih hormona;
- hipotireoidizam, koji u težim slučajevima kod odraslih dovodi do miksedema, a kod dece uzrokuje kretinizam;
- netoksičnu strumu (gušavost), izazvanu nedostatkom joda u ishrani, sa normalnom funkcijom tireoidne žlezde [5].

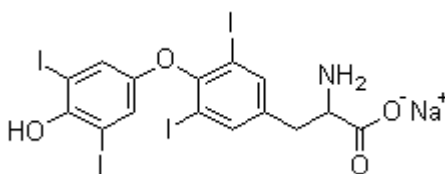
Na osnovu odgovarajućih biohemijskih određivanja (ukupni tiroksin, ukupni trijodotironin, slobodni hormoni u plazmi, tireoidna auto-antitela) moguće je izvršiti tačnu dijagnozu navedenih hipotireoidnih i hipertireoidnih stanja, kao i pratiti efikasnost primenjene terapije [4].

### **1.1.4 Terapija hipotireoidizma**

S obzirom da ne postoje lekovi koji mogu da povećaju sintezu ili oslobađanje tireoidnih hormona, jedini način lečenja hipotireoidizma predstavlja primena samih hormona u vidu supstitucione terapije, pri čemu je tiroksin lek izbora [6, 7].

## 1.2 Opšte karakteristike levotiroksina

Levotiroksin u obliku natrijumove soli je sintetska zamena prirodnog hormona tireoidne žlezde i koristi se u stanjima u kojima nastaje deficit tiroksina. Empirijska formula levotiroksin-natrijuma je  $C_{15}H_{10}I_4NNaO_4$ , molekulska masa iznosi 798.86 g/mol (anhidrovani oblik), a strukturna formula je prikazana na slici 3 [8]:



INN: Levotiroksin-natrijum

Hemijsko ime: natrijum(2S)-2-amino-3-[4-(4-hidroksi-3,5-dijodofenoksi)-3,5-dijodofenil]propanoat

**Slika 3.** Strukturna formula levotiroksin-natrijuma

Levotiroksin-natrijum je skoro beo ili slabo braonkasto-žut prašak ili fini kristalni prašak, higroskopan, bez mirisa i ukusa. Vrlo je teško rastvorljiv u vodi, teško rastvorljiv u 96% V/V etanolu, dok se rastvara u razblaženim rastvorima alkalnih hidroksida [8]. Na temperaturi od 25 °C i relativnoj vlažnosti 10-75%, levotiroksin-natrijum se nalazi u obliku pentahidrata [9]. Pri zagrevanju u struji azota dolazi do postepene dehidracije pentahidrata, pri čemu nastaju dihidrat, monohidrat i, na kraju, amorfni oblik levotiroksina. Međutim, pri ambijentalnim uslovima, pentahidrat je stabilan godinama. Levotiroksin-natrijum pokazuje izuzetno malu intrinzičnu brzinu rastvaranja od 0.0002 mg/min/cm<sup>2</sup> u opsegu fizioloških pH vrednosti, ali je pokazano da u vodenom medijumu formira velike agregate (50-100 nm u prečniku), što omogućava da dostigne visoke koncentracije [9].

Osnovni cilj supstitucione terapije je postizanje i održavanje eutireoidnog stanja, kao i postizanje inhibicije rasta i/ili funkcije abnormalnog tireoidnog tkiva [10-12]. Doza leka koja je potrebna za postizanje ovih ciljeva zavisi od brojnih faktora uključujući starost pacijenta, telesnu masu, kardiovaskularni status, konkomitantne bolesti i lekove. Iz tih razloga doziranje mora biti individualizovano i terapija se mora

pratiti. Levotiroksin se u obliku tableta sa trenutnim oslobađanjem primenjuje u vidu pojedinačne dnevne doze, obično pola sata do sat pre doručka. Prosečna supstitucionarna doza iznosi 100-125 µg dnevno za odrasle osobe, dok kod starijih pacijenata dovoljna može biti i doza manja od 70 µg dnevno [12]. Doze veće od 200 µg dnevno su retko potrebne. Početna doza je manja i postepeno se povećava svake 2 do 4 nedelje do postizanja normalnog metabolizma [12].

### 1.2.1 Fizičko-hemijske i biofarmaceutske osobine

Levotiroksin je amfoterna supstanca sa tri vrednosti konstante disocijacije (pKa): 2.2, 6.7 i 10.1 [13]. Različiti literaturni podaci i *in silico* predviđene vrednosti za oktanol/voda particioni koeficijent (logP iznosi od 1.15 do 2.39) ukazuju na lipofilnu prirodu ove supstance [14-16]. Iako bi se na osnovu lipidne prirode očekivalo da levotiroksin lako prolazi kroz intestinalnu membranu, visokopolarna cviter-jonska struktura bočnog lanca koji sadrži ostatak aminokiseline alanina (slika 3) sprečava prolaz molekula kroz hidrofobni unutrašnji lipidni dvosloj membrane, što dovodi do smanjene permeabilnosti [17]. *In vitro* ispitivanjem na MDCK ćelijama dobijena je vrednost za efektivnu permeabilnost od  $0.54 \pm 0.06 \times 10^{-6}$  cm/min, dok je *in silico* predviđena vrednost za humanu efektivnu permeabilnost na osnovu strukture molekula  $1.34 \pm 10^{-4}$  cm/s [16, 17]. S obzirom da koeficijent permeabilnosti za metoprolol, koji se smatra visoko permeabilnom supstancom i referentnim standardom za procenu stepena permeabilnosti, iznosi  $1.4 \pm 10^{-4}$  cm/s, može se zaključiti da se levotiroksin nalazi na samoj granici između supstanci niske i visoke permeabilnosti [15].

Rastvorljivost levotiroksina u vodi je pH-zavisna [18]. U literaturi se mogu pronaći podaci za rastvorljivost u vodi koji variraju u opsegu od 0.00898 - 0.15 mg/ml [14, 18-20]. U skladu sa tim, kao i zbog nedostatka validnih podataka o permeabilnosti, i literaturni podaci o klasifikaciji ove supstance u okviru Biofarmaceutskog sistema klasifikacije lekova (*Biopharmaceutics Classification System, BCS*) su krajnje kontradiktorni, pa se tako može pronaći da pripada BCS klasi I, BCS klasi II, kao i BCS klasi III [15, 21, 22]. Interesantno je da je ubrzo nakon izdavanja smernice za studije bioekvivalencije levotiroksin-natrijum tableta od strane Američke agencije za hranu i lekove (*The Food and Drug Administration, FDA*) došlo i do značajnih promena propisanih eksperimentalnih uslova od strane Američke farmakopeje (*United States*

*Pharmacopoeia, USP*) za ispitivanje brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz tableta sa trenutnim oslobađanjem [23]. USP 24 je propisivala upotrebu fosfatnog pufera pH 7.4 u aparaturi sa lopaticom, pri brzini od 100 rpm, pri čemu je kao zahtev bio postavljen uslov da se minimalno 55% supstance rastvori za 80 minuta [24]. Ovi uslovi su promenjeni prvi put u USP 25, koja je propisivala upotrebu 0.01 M HCl sa 0.2% natrijum-laurilsulfata (NaLS), u aparaturi sa lopaticom, pri brzini od 50 rpm, pri čemu je zahtev promenjen na minimalno 70% za 45 minuta [25]. USP 30 je davala još fleksibilnije uslove, brzinu obrtanja od 50 ili 75 rpm, u 0.01 M HCl sa ili bez surfaktanta [26]. Ovakve uslove propisuje i trenutno važeća USP 34 [8]. U literaturi se mogu pronaći i studije u kojima se za ispitivanje brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz tableta koristi 0.05 M rastvor amonijum-acetata sa 0.05% natrijum-laurilsulfata (NaLS), pH vrednosti u rasponu od 1.2 do 8.0, u cilju ispitivanja uticaja pH vrednosti medijuma na brzinu rastvaranja [18].

Do danas je u stručnoj literaturi objavljen samo jedan rad u kome je ispitana mogućnost uspostavljanja korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka za levotiroksin [27]. Rezultati su pokazali da se bolji stepen višestruke korelacije nivoa C uspostavlja kada se ispitivanje brzine rastvaranja vrši u skladu sa uslovima koji su važili u USP 24 i da *in vitro* podaci dobijeni u skladu sa eksperimentalnim uslovima datim u USP 34 ne odražavaju adekvatno *in vivo* ponašanje leka [27].

### **1.2.2 Farmakokinetički podaci**

#### *Resorpcija*

Resorpcija levotiroksina iz gastrointestinalnog trakta je varijabilna, pri čemu se postiže relativna biološka raspoloživost od 40-80% [12, 28, 29]. Najveći deo primenjene doze se resorbuje iz jejunuma i gornjeg dela ileuma [28, 29]. Relativna biološka raspoloživost tableta levotiroksina u odnosu na istu dozu rastvora levotiroksina je oko 93% [12]. Pretpostavlja se da su u resorpciju levotiroksina uključeni transporteri, kao što je OATP [28]. Stepem resorpcije levotiroksina se smanjuje u prisustvu rastvorljivih dijetetskih vlakana koja vezuju levotiroksin i onemogućavaju njegovu difuziju u lumen creva. Malapsorptivna stanja takođe smanjuju stepem resorpcije levotiroksina, dok gladovanje povećava biološku raspoloživost ovog leka [28].

### *Distribucija*

Levotiroksin se distribuira u mnoga tkiva i telesne tečnosti organizma, pri čemu se najveća koncentracija postiže u jetri i bubrežima. Tireoidni hormoni ne prolaze kroz placentu i supstituciona terapija trudnica ne bi trebalo da se prekida u toku trajanja trudnoće. Minimalne količine tireoidnih hormona se izlučuju putem majčinog mleka. Više od 99% levotiroksina se vezuje za proteine plazme i to za tiroksin vezujući globulin (*thyroxine binding globulin*, TBG), tiroksin vezujući prealbumin (*thyroxine binding prealbumin*, TBPA) i albumin [4]. U fiziološkim uslovima, 60-75% levotiroksina se transportuje putem TBG, 15-30% putem TBPA i 10% putem albumina. Slobodna frakcija, iako čini samo 0.05% ukupnog levotiroksina, je frakcija koja se konvertuje u aktivni metabolit trijodotironin [4]. Promene u nivou proteina plazme imaju uticaj na koncentraciju vezanog, ali ne i slobodnog levotiroksina. Neki lekovi, kao i različita patološka i fiziološka stanja, mogu dovesti do promena u stepenu vezivanja levotiroksina za proteine i/ili do promena u koncentraciji plazmatskih proteina koji vezuju tireoidne hormone (npr. trudnoća i estrogeni povećavaju TBG, a nefrotski sindrom i druga stanja koja dovode do gubitka proteina smanjuju njegov nivo). Veći afinitet TBG i TBPA za levotiroksin delimično objašnjava više nivoe u plazmi, sporiji metabolički klirens i duži poluživot levotiroksina u odnosu na trijodotironin.

### *Eliminacija*

Uobičajeno poluvreme eliminacije levotiroksina je 6 do 7 dana, a trijodotironina 1 do 2 dana [12]. Poluvreme eliminacije oba tireoidna hormona je skraćeno kod pacijenata sa hipertireoidizmom (3 do 4 dana), a produženo kod pacijenata sa hipotireoidizmom (9 do 10 dana).

Najvažniji put metabolisanja levotiroksina je postepena dejodinacija, pri čemu se 85% dnevno oslobođenog levotiroksina dejodinira u perifernim tkivima, prvenstveno u jetri i bubrežima, u trijodotironin i reverzni trijodotironin (izomer trijodotironina koji nema hormonsku aktivnost) [4, 12]. Trijodotironin se dalje dejodinira u tireosirćetnu kiselinu (4-hidroksifenoksisifenilsirćetnu kiselinu) koja čini 12 do 22% doze koja se izlučuje urinom. Procesima konjugacije sa glukuronskom i sumpornom kiselinom iz levotiroksina nastaju produkti razgradnje koji se izlučuju putem žuči. Produkti razgradnje izlučeni putem žuči se delom hidrolizuju u crevima i ponovo se resorbuju (ekstrahepatička cirkulacija), a delom se hidrolizuju u kolonu i izlučuju fecesom

(približno 20 do 40% tiroksina). Oslobođeni jod preuzima tireoidna žlezda, koja ga ponovo koristi za sintezu hormona. Između 30 i 55% primenjene doze levotiroksina se izlučuje urinom, a 20 do 40% doze se eliminiše fecesom. Bolesti bubrega ili jetre ne utiču na eliminaciju levotiroksina.

### **1.2.3 Klinička bezbednost i toksikološki podaci**

Neželjeni efekti levotiroksina u toku kliničke primene mogu biti: tahikardija, anginozni bol, aritmije, glavobolja, nemir, znojenje, nesanica, tremor, groznica, dijareja, prekomerni gubitak telesne mase, povraćanje. Svi neželjeni efekti su prolaznog karaktera i prestaju ili se znatno ublažavaju smanjenjem doze ili prestankom davanja leka. Retko se može javiti reakcija preosetljivosti na ekscipijense u sastavu proizvoda, i to u vidu urtikarije, osipa, svraba, angioedema, artralgijske i serumske bolesti.

Klinička bezbednost leka je dobra, osim ako se ne prekorače preporučene doze. U tom slučaju se mogu javiti navedeni neželjeni efekti. Terapija akutnog predoziranja je simptomatska i suportivna. Pacijenti moraju biti pod produženim lekarskim nadzorom, jer simptomi i znaci predoziranja mogu biti odloženi i do 6 dana usled postepene konverzije levotiroksina u trijodotironin. Kod starih osoba i kod pacijenata sa dugotrajnim hipotireoidizmom potrebno je postepeno uvođenje levotiroksina u terapiju.

Levotiroksin ne prolazi lako placentalnu barijeru. Supstitucionu terapiju levotiroksinom treba nastaviti i tokom trudnoće, a ako je u trudnoći dijagnostikovana hipotireoidizam terapiju levotiroksinom treba odmah započeti. Trudnicama koje su na supstitucionoj terapiji levotiroksinom može biti potrebno povećanje doze. Minimalne koncentracije levotiroksina se izlučuju mlekom. Iako ozbiljne neželjene reakcije na lek kod odojčadi nisu zabeležene, neophodan je oprez prilikom primene levotiroksina kod majki koje doje. Smatra se da količina tireoidnih hormona koja se izluči putem majčinog mleka nije dovoljna da bi se zadovoljile potrebe odojčadi sa nefunkcionalnom tireoidnom žlezdom.

Toksični efekti proizvoda koji sadrže levotiroksin su, zbog konvertovanja levotiroksina u trijodotironin, neželjeni efekti oba tireoidna hormona.



#### 1.2.4 Biološka ekvivalentnost tableta levotiroksina

Levotiroksin u obliku natrijumove soli je prisutan na tržištu u vidu tableta različitih proizvođača, ali njihova terapijska ekvivalentnost i međusobna zamenljivost ostaju diskutabilni i pored dokazane relativne biološke raspoloživosti, odnosno bioekvivalencije [30-34]. Naime, principi i načini određivanja bioekvivalentnosti preparata ovog tireoidnog hormona su poslednjih godina predmet debata stručne javnosti, iako se ovi proizvodi nalaze u upotrebi preko pet decenija. Jedna od ključnih stvari koja mora biti uzeta u obzir pri određivanju farmakokinetičkog profila ovog leka je, osim kod atireoidnih pacijenata, postojanje endogenog (*baseline*) nivoa hormona u krvi, koji može biti veoma varijabilan i koji se ne može jasno razlikovati od egzogenog levotiroksina. Trenutno važeća smernica za studije bioekvivalencije izdata od strane Evropske agencije za lekove (*European Medicines Agency*, EMA) daje preporuke da uzimanje uzoraka u studiji bioekvivalencije lekova koji su endogeno prisutni mora biti takvo da omogućava karakterizaciju endogenog nivoa leka za svakog ispitanika u svakom periodu studije [35]. Preporučuje se da se endogeni nivo leka odredi na osnovu 2 do 3 uzorka uzeta u kratkim intervalima neposredno pre same primene leka i da se taj nivo koristi prilikom farmakokinetičke evaluacije, tako da izračunati parametri odgovaraju samo koncentracijama koje potiču od egzogeno datog leka [35]. FDA je 2000. godine izdala smernicu za studije bioekvivalencije tableta sa trenutnim oslobađanjem levotiroksin-natrijuma, prema kojoj se za procenu bioekvivalencije koristi unakrsni (*cross-over*) dizajn nakon primene pojedinačne doze od 600 µg, u uslovima na gladno i sa *wash-out* periodom od 35 dana [23]. Međutim, validnost predloženih standarda je dosta diskutovana u stručnoj javnosti, pri čemu se mogu izdvojiti sledeće osnovne primedbe:

- interferencija endogenog nivoa hormona, način otklanjanja ove interferencije metodom korekcije ukupnog nivoa u odnosu na endogeni nivo i njen uticaj na tačnost određivanja koncentracije;
- korišćenje relativno visoke doze u studiji bioekvivalencije;
- neusaglašenosti oko klasifikacije levotiroksina u grupu lekova uske terapijske širine;

- regulacija nivoa levotiroksina preko hipotalomusno-hipofizno-tireoidne sprege čija se aktivnost ne može izbjeći u studiji bioekvivalencije [30-34].

#### **1.2.4.1 Korekcija ukupnog nivoa levotiroksina u odnosu na endogeni nivo**

FDA smernica za studije bioekvivalencije tableta sa trenutnim oslobađanjem levotiroksin-natrijuma preporučuje metodu korekcije koja se sastoji od oduzimanja srednje vrednosti koncentracija levotiroksina u tri uzorka krvi uzeta neposredno pre davanja leka od svake ukupne očitane koncentracije levotiroksina [23]. Naime, relativno visok endogeni nivo hormona može da maskira razlike između ispitivanih preparata. Ukoliko je endogeni nivo mali u odnosu na ukupnu koncentraciju hormona i njegov uticaj na određivanje bioekvivalencije će biti minimalan. Što je ovaj nivo veći, veća je i greška koja nastaje pri određivanju bioekvivalencije. Rezultati nekoliko studija bioekvivalencije preparata levotiroksina ukazuju na to da korišćenje nekorigovanih vrednosti farmakokinetičkih parametara za procenu bioekvivalencije može sa velikom verovatnoćom dovesti do proglašavanja dva preparata bioekvivalentnim, pri čemu se oni, u stvari, razlikuju i do 35% [30]. Iz tih razloga, korigovanje ukupnog nivoa levotiroksina u odnosu na endogeni nivo povećava tačnost određivanja relativne biološke raspoloživosti. Metoda korekcije navedena u FDA smernici se zasniva na pretpostavci da nema supresije endogene produkcije levotiroksina nakon davanja pojedinačne doze egzogenog leka, čime se zanemaruju diurnalne varijacije u sekreciji ovog hormona. Blakesley i saradnici su predložili metodu korekcije kojom se ukupna izmerena koncentracija levotiroksina nakon davanja leka koriguje u odnosu na koncentraciju izmerenu u isto vreme 24 sata pre davanja leka, čime se uzima u obzir diurnalna varijacija u sekreciji levotiroksina kod svakog ispitanika pojedinačno [33, 34]. Međutim, pokazano je da i ova metoda takođe može dovesti do grešaka, jer se zasniva na vrednostima endogenog levotiroksina određenim dan pre davanja egzogenog leka i da nema nikakavu suštinsku prednost u odnosu na metodu tri tačke [30].

#### **1.2.4.2 Doza u studiji bioekvivalencije**

Korišćenje doze od 600 µg, koja je mnogo veća od uobičajene kliničke doze, je takođe predmet kritika važeće smernice [30, 34]. Međutim, upotreba ovako visokih

doza se može tolerisati u studijama bioekvivalencije endogenih preparata, pod uslovom da primenjena doza ne dovodi do pojave neželjenih efekata i neće ugroziti ispitanika. Nižim dozama levotiroksina se postižu koncentracije koje su bliže endogenom nivou hormona, čime se smanjuje tačnost i povećava greška prilikom određivanja bioekvivalencije ovih preparata. Nema sumnje da upotreba najveće moguće doze koja se može tolerisati daje i najrealniju procenu relativne biološke raspoloživosti.

#### **1.2.4.3 Levotiroksin kao lek uske terapijske širine**

Neusaglašenosti postoje i oko klasifikacije levotiroksina u grupu lekova uske terapijske širine. U praksi, on se primenjuje i prati kao i ostali lekovi uske terapijske širine. Međutim, u literaturi se ne može naći nijedna studija koja podržava ovu klasifikaciju, niti FDA smernica preporučuje korišćenje užeg intervala pouzdanosti od onog koji se uobičajeno koristi za studije bioekvivalencije (80-125%) [23]. Sve dok ne bude bio dostupan pouzdan naučni dokaz da je potrebno suprotno postupiti, u praksi se primenjuju uobičajeni zahtevi za uspostavljanje bioekvivalencije.

Navodi da odsustvo terapijske ekvivalentnosti preparata levotiroksina može prosteći iz neodgovarajućeg sadržaja aktivne supstance i/ili nedovoljnog oslobađanja iz tableta se takođe mogu naći u literaturi [36-38]. Zapaženo je da izostanak adekvatnog terapijskog odgovora može nastati zbog i do 30% nižeg sadržaja levotiroksina u tableti u odnosu na deklarisanu vrednost [36-38]. S obzirom da levotiroksin spada u niskodozirane lekove, tablete levotiroksina mogu pokazati neujednačenost u pogledu sadržaja između različitih serija zbog loše homogenizacije. Iz svih ovih razloga nedavno su predložene uže specifikacijske granice za sadržaj levotiroksina prilikom puštanja serija u promet [39].

## 2 BIOFARMACEUTSKA KARAKTERIZACIJA LEKOVA

Biofarmaceutska karakterizacija lekova obuhvata niz *in vivo*, *in vitro* i *in silico* ispitivanja pomoću kojih je moguće identifikovati mehanizam oslobađanja lekovite supstance iz preparata, definisati faktore koji utiču na brzinu rastvaranja supstance *in vitro* i *in vivo*, izabrati eksperimentalne uslove za ispitivanje brzine rastvaranja koji će biti u korelaciji sa *in vivo* rezultatima i utvrditi profil rastvaranja, odnosno resorpcije lekovite supstance *in vivo* i njenu biološku raspoloživost. Podaci dobijeni biofarmaceutskom karakterizacijom lekovitih supstanci, u kombinaciji sa farmakokinetičkim podacima, imaju veoma bitnu ulogu u fazi razvoja lekovite supstance, kada je između nekoliko hiljada potencijalnih kandidata potrebno izabrati one koji su zadovoljavajući sa aspekta bezbednosti i efikasnosti, ali i kasnije, u toku razvoja i optimizacije formulacije.

### 2.1 Biološka raspoloživost i biološka ekvivalentnost lekova

Farmakokinetička analiza nakon intravenske primene, kojom se postiže potpuna raspoloživost datog leka, predstavlja najprecizniji način procene njegovih farmakokinetičkih parametara. Međutim, ekstravaskularna primena leka sa ciljem postizanja sistemskog dejstva, pre svega oralna primena, je mnogo češća u terapiji od direktnog injiciranja leka u vaskularni sistem.

Oralna (*per os*) primena leka predstavlja neinvazivan i za pacijente često najprihvatljiviji put uzimanja leka. Jedno od ključnih pitanja u procesu razvoja svakog novog leka je da li se on može efikasno primeniti *per os* da bi ostvario željeni sistemski efekat. Formulacija odgovarajućeg doziranog oblika za ovaj način primene leka predstavlja pravi izazov u farmaceutskoj industriji, s obzirom na veliki broj nezavisnih faktora koji utiču na proces resorpcije lekovite supstance iz gastrointestinalnog trakta. Nakon oralne primene, lek je izložen mnogobrojnim fizičkim, hemijskim i biološkim promenama koje definišu njegovu sudbinu u organizmu. Koncept biološke raspoloživosti i biološke ekvivalencije je upravo i razvijen sa ciljem da objasni i kvantifikuje ove promene.

Biološka raspoloživost predstavlja stepen u kome i brzinu kojom aktivni princip ili terapijska celina iz lekovitog preparata postaju raspoloživi na mestu delovanja leka

[40]. Kako je krajnji terapijski efekat primenjenog leka, najčešće, funkcija njegove koncentracije u sistemsnoj cirkulaciji, raspoloživost leka iz farmaceutske forme je kritičan faktor koji određuje njegovu kliničku efikasnost.

Biološka raspoloživost ispitivanog preparata primenjenog ekstravaskularno, u poređenju sa intravenski datim standardom, koji se smatra 100% raspoloživim, predstavlja apsolutnu biološku raspoloživost [40]. Kako je ukupna količina leka koja stiže u sistemsku cirkulaciju direktno proporcionalna površini ispod krive koncentracije leka u plazmi u funkciji vremena (PIK), apsolutna biološka raspoloživost (F) se može odrediti iz sledeće jednačine [40]:

$$F = \frac{PIK_{EV}}{PIK_{IV}}$$

gde su  $PIK_{EV}$  i  $PIK_{IV}$  površine ispod krive koncentracija leka u plazmi u funkciji vremena nakon ekstravaskularne i intravenske primene date doze leka.

Za razliku od novih lekova, kod kojih su potrebna detaljna farmakokinetička i ispitivanja apsolutne biološke raspoloživosti, kod generičkih lekova se vrši procena relativne biološke raspoloživosti, odnosno biološke ekvivalentnosti, poređenjem sa odgovarajućim referentnim preparatom. Biološka ekvivalentnost preparata nekog leka se postiže ako se njegova brzina i stepen resorpcije ne razlikuju značajno od brzine i stepena resorpcije referentnog preparata koji se primenjuje istim putem u istoj dozi. Relativna biološka raspoloživost se može izračunati iz sledeće jednačine [40]:

$$F = \frac{PIK_T}{PIK_R}$$

gde su  $PIK_T$  i  $PIK_R$  površine ispod krive koncentracije leka u plazmi u funkciji vremena nakon ekstravaskularne primene test i referentnog preparata u istoj dozi.

Ukoliko su ispitivani preparati primenjeni u različitim dozama, relativna biološka raspoloživost se može izračunati iz sledeće jednačine [40]:

$$F = \frac{PIK_T D_R}{PIK_R D_T}$$

Iako postoje definisani kriterijumi i propisi za ispitivanje biološke raspoloživosti i biološke ekvivalentnosti lekova, ova oblast farmakokinetičkog istraživanja je i dalje predmet interesa i diskusija naučne i stručne javnosti, u cilju harmonizacije i

usavršavanja određenih stavova, jer su generički lekovi u širokoj primeni u terapiji i od ključnog je značaja obezbediti njihov kvalitet, bezbednost i efikasnost [41-45].

### **2.1.1 Faktori koji utiču na biološku raspoloživost**

Da bi terapijski efekat lekovite supstance iz oralno primenjenog čvrstog farmaceutskog oblika bio ostvaren, lek se mora resorbovati, pri čemu se ovaj proces sastoji iz tri različita koraka:

- dezintegracije farmaceutskog oblika;
- rastvaranja lekovite supstance;
- prolaska lekovite supstance kroz membrane gastrointestinalnog trakta u sistemsku cirkulaciju.

Svaki faktor koji može uticati na bilo koji od ova tri koraka utiče i na biološku raspoloživost leka i ostvarivanje njegovog terapijskog efekta. Tako brzina i stepen resorpcije zavise od mnogobrojnih faktora kao što su fizičko-hemijske karakteristike lekovite supstance, faktori formulacije, kao i fiziološki faktori na nivou gastrointestinalnog trakta [46, 47]. Pregled ovih faktora dat je u tabeli 1.

Procenom svakog od ovih faktora pojedinačno, kao i sagledavanjem njihovog međusobnog sudejstva i mogućeg zajedničkog efekta, može se predvideti mesto, brzina i stepen resorpcije lekovite supstance iz ispitivanog farmaceutskog oblika. Ova razmatranja su neophodna u fazi razvoja formulacije, ali i kasnije, prilikom optimizacije formulacije radi sprovođenja određenih postregistracionih izmena, koje za cilj imaju dobijanje što kvalitetnijeg proizvoda.

**Tabela 1.** Faktori koji utiču na biološku raspoloživost leka [47]

Fizičko-hemijski faktori	Farmaceutsko-tehnološki faktori	Fiziološki faktori
Veličina čestica	Farmaceutski oblik	pH na nivou GIT-a
Kristalna struktura	Količina dezintegratora	Vreme pražnjenja želuca
Rastvorljivost	Količina lubrikansa	Motilitet
Građenje soli	Metoda izrade	Prirodni surfaktanti
Građenje estara	Sila kompresije	Komponente hrane
Stabilnost		Metabolizam prvog prolaza
Interakcije		Starost, pol
Nečistoće		Bolesti

### 2.1.2 Studije biološke ekvivalentnosti

Potreba za ispitivanjem ekvivalencije različitih formulacija iste aktivne supstance proistekla je iz neuspeha nekih generičkih lekova da obezbede očekivani nivo terapijske efikasnosti i bezbednosti, kada se primene u istoj dozi i istim putem kao i originalni preparat primenjen kao standard [48, 49]. Prilikom uvođenja novog generičkog leka na tržište nije neophodno izvođenje svih kliničkih ispitivanja kao što je to slučaj kod preparata koji sadrže novu lekovitu supstancu, već je dovoljno izvršiti procenu biološke ekvivalentnosti, poređenjem sa odgovarajućim referentnim preparatom, što je osnova za skraćen postupak registracije leka [50, 51]. Glavna prednost klasičnih studija bioekvivalencije jesu strogo kontrolisani uslovi, što doprinosi visokoj pouzdanosti u zaključivanju.

Ispitivanja biološke raspoloživosti i biološke ekvivalentnosti se izvode *in vivo*, na zdravim dobrovoljcima, u skladu sa odgovarajućim etičkim standardima. Ove *in vivo* studije predstavljaju najpouzdaniji način da se utvrdi terapijska ekvivalentnost ispitivanih preparata. Očekuje se da su dva bioekvivalentna preparata takođe i terapijski ekvivalentna, što omogućava njihovu međusobnu zamenljivost. FDA je 1977. godine izdala prvu smernicu za izvođenje studija biološke raspoloživosti i biološke ekvivalentnosti, prepoznavši potrebu za uređivanjem ove oblasti *in vivo* ispitivanja, s obzirom na njihovu kompleksnost i značaj [52]. Od tada postoji tendencija stalnog

preispitivanja i usavršavanja stavova i propisa iz ove oblasti, radi što potpunijeg pristupa proceni lekovite supstance i njenog farmaceutskog oblika.

U saglasnosti sa trenutno važećim smernicama, studija bioekvivalencije treba da bude tako dizajnirana da omogući procenu uticaja faktora formulacije i faktora proizvodnog procesa na biološku raspoloživost lekovite supstance [35, 53]. Prilikom procene potrebe za izvođenjem studije bioekvivalencije treba uzeti u obzir parametre koji se odnose kako na lekovitu supstancu, tako i na farmaceutski oblik leka.

Studije bioekvivalencije se prvenstveno izvode na zdravim ispitanicima, starosti 18 i više godina, pri čemu se moraju poštovati svi važeći etički standardi i propisi [40, 54, 55]. U određenim slučajevima se ispitivanja mogu izvoditi na bolesnicima, u toku trajanja terapije ispitivanim lekom. Za lekovite supstance jednostavne farmakokinetike se najčešće primenjuje unakrsni (*cross-over*) dizajn, posle primene pojedinačne doze leka pre obroka (u uslovima na gladno). Minimalan broj ispitanika koji može učestvovati u ovakvom dizajnu je 12. *Cross-over* dizajn, u kome svaki dobrovoljac prima i test i referentni preparat i služi sam sebi kao kontrola, se koristi da bi se smanjio uticaj demografske heterogenosti i fiziološke varijabilnosti unutar grupe na rezultate studije. Preporučuje se takva polna, starosna i etnička struktura uzorka koja će realno odražavati ciljnu populaciju kojoj su dati preparati namenjeni. Ispitanici ne smeju uzimati druge lekove bar 7 dana pre početka ispitivanja, kao ni tokom same studije. Obavezno gladovanje u trajanju od obično 8 sati pre uzimanja doze omogućava eliminisanje uticaja hrane na kinetiku u fazi resorpcije. Ako studija podrazumeva ispitivanje mogućih interakcija sastojaka hrane i lekovite supstance, uvode se kontrolisani obroci. Količina tečnosti sa kojom se uzima preparat treba da bude najmanje 150 ml. Obroci i tečnosti koje se uzimaju i pre i posle primene preparata treba da budu standardizovani u pogledu sastava za celo vreme trajanja ispitivanja. Ispitanici se randomizirano (nasumično) raspodeljuju u grupe u okviru kojih dobijaju i ispitivani i referentni preparat, uz odgovarajuću vremenski period (*wash-out*) između njihove primene (tabela 2). *Wash-out* period mora iznositi minimalno 5 poluvremena eliminacije leka.



**Tabela 2.** Dvostruki unakrsni (*cross-over*) dizajn

Grupa ispitanika	Tretman	
	Period 1	Period 2
I	T	R
II	R	T

T-test preparat, R-referentni preparat

U slučaju kada se radi o lekovitim supstancama koje pokazuju dozno ili vremenski zavisnu farmakokinetiku ili kada su u pitanju preparati sa modifikovanim oslobađanjem, ispitivanja biološke ekvivalentnosti se vrše i posle ponovljenog doziranja, u stanju ravnoteže (*steady-state*) [40, 56, 57]. Ovakav način ispitivanja se primenjuje i u slučaju veoma niskih koncentracija leka, kao i nedostatka dovoljno osetljive analitičke metode za merenje koncentracije leka u biološkom materijalu [35].

Kao referentni preparat u studiji bioekvivalencije koristi se prvi registrovan preparat sa ispitivanom lekovitom supstancom u odgovarajućem farmaceutskom obliku. Takođe se može koristiti preparat istog proizvođača registrovan na lokalnom tržištu, ukoliko se on ne razlikuje značajno u kvalitativnom i kvantitativnom sastavu od referentnog preparata. Ispitivani preparat takođe mora biti proizveden na propisan način, u količini koja predstavlja 1/10 optimalne proizvodne serije ili 100000 jedinica farmaceutskog oblika, ukoliko je 1/10 proizvodne serije manja od 100000 jedinica [35].

Sakupljanje uzoraka odgovarajućeg biološkog materijala posle primene preparata mora biti unapred definisano Protokolom studije, u odgovarajućim vremenskim intervalima, kako bi se što tačnije konstruisao profil zavisnosti koncentracije leka u funkciji vremena. Ako je biološki materijal krv, sakupljanje uzoraka se vrši 3 do 5 poluvremena eliminacije ispitivanog leka. Ukoliko se prati kumulativno izlučivanje leka urinom, sakupljanje uzoraka se vrši 7 do 10 poluvremena eliminacije. Vremenski interval uzorkovanja duži od 72 sata nije potreban za preparate sa trenutnim oslobađanjem lekovite supstance [35].

Bioanalitička metoda koja će se koristiti za određivanje koncentracije lekovite supstance u sakupljenim uzorcima mora biti u potpunosti validirana i dokumentovana, a ispitivanje mora da se vrši u skladu sa principima Dobre laboratorijske prakse (*Good Laboratory Practice*, GLP) [58-60].

Farmakokinetička analiza dobijenih podataka o koncentracijama leka u sakupljenim uzorcima biološke tečnosti vrši se model-nezavisno, neparаметarskom analizom. Kada se ispitivanje biološke ekvivalencije vrši nakon pojedinačnog doziranja, određuju se površine ispod krive koncentracija leka u plazmi u funkciji vremena ( $PIK_{0-t}$ ,  $PIK_{0-\infty}$ ), maksimalna koncentracija leka u plazmi ( $C_{max}$ ) i vreme do postizanja maksimalne koncentracije ( $t_{max}$ ). Kada se ispitivanje biološke ekvivalencije vrši nakon ponovljenog doziranja u stanju ravnoteže, određuju se površine ispod krive koncentracija leka u plazmi u funkciji vremena u toku jednog intervala doziranja u stanju ravnoteže ( $PIK_{ss}$ ), maksimalna koncentracija leka u plazmi u stanju ravnoteže ( $C_{max,ss}$ ), vreme za koje je postignuta maksimalna koncentracija leka u plazmi u stanju ravnoteže ( $t_{max,ss}$ ) i procenat fluktuacije.

Na podatke se mora primeniti odgovarajuća statistička analiza [35, 61]. Cilj statističke analize je da se pokaže da, ukoliko postoje male razlike između ispitivanih preparata, one nisu kliničke značajne. U statističkoj analizi se koristi analiza varijanse (ANOVA), pri čemu se prethodno vrši logaritamska transformacija podataka. Takođe se mogu koristiti i statistički testovi za intervalno ocenjivanje i procenu biološke ekvivalentnosti, odnosno odsustva ekvivalentnosti, kao i testovi sa nultom hipotezom o odsustvu ekvivalentnosti (Westlake test ili Hauck test verovatnoće). Na ovaj način se pokazuje da li postoji značajna razlika između ispitivanih parametara.

Procena biološke ekvivalentnosti se zasniva na izračunavanju 90% intervala pouzdanosti (90% *confidence interval*, CI) za odnos geometrijskih sredina za ispitivani i referentni preparat za razmatrane parametre [35]. Za  $PIK$  i  $C_{max}$  90% CI za odnos između ispitivanog i referentnog preparata mora biti unutar intervala 80-125%. 90% CI treba da se predstavi sa dve decimale, pri čemu donja granica mora biti  $\geq 80.00$ , a gornja granica  $\leq 125.00$ . U određenim slučajevima moguće je promeniti vrednosti granica za interval pouzdanosti. Kada su u pitanju lekovi uske terapijske širine, preporučuje se korišćenje intervala od 90-111%. Takođe, s obzirom da je  $C_{max}$  kao farmakokinetički parameter od manjeg značaja sa aspekta kliničke bezbednosti i efikasnosti u odnosu na  $PIK$ , moguće je primeniti širi interval pouzdanosti (75-133%), ukoliko je to definisano Protokolom studije i ukoliko je prethodno dokazano da je proširenje granica opravdano [35, 62, 63]. Proširenje granica se ne može primeniti na

PIK. Statistička procena  $t_{max}$  ima smisla samo ako postoje izraziti neželjeni efekti ili ako lekovita supstanca ima veoma brzo delovanje.

Po završetku studije bioekvivalencije, potrebno je odgovarajućem regulatornom telu dostaviti Izveštaj o završenom ispitivanju, kako bi se izvršila odgovarajuća procena i donela odluka o registrovanju leka (tabela 3).

Kada je u pitanju ispitivanje biološke raspoloživosti i biološke ekvivalentnosti preparata koji sadrže analoge endogenih supstanci, neophodna su posebna razmatranja [64-66]. FDA je izdala specijalne smernice kada je u pitanju ispitivanje biološke ekvivalentnosti nekih od tih preparata (*Levothyroxine Sodium Tablets-In Vivo Pharmacokinetic and Bioavailability Studies and In Vitro Dissolution Testing; Potassium Chloride Modified-Release Tablets and Capsules: In Vivo Bioequivalence and In Vitro Dissolution Testing*) [23, 67]. Problemi koji se javljaju prilikom ispitivanja biološke ekvivalentnosti preparata koji sadrže analoge endogenih supstanci su postojanje endogenog nivoa supstance, uticaj fiziološke povratne sprege, uticaj cirkadijalnog ritma i nedovoljna osetljivost analitičkih metoda za određivanje koncentracije. Postojanje endogenog nivoa, koji se menja nakon primene ispitivanog preparata u skladu sa delovanjem odgovarajuće fiziološke sprege, predstavlja pravi izazov za dokumentovanje bioekvivalencije ovih preparata. U najvećem broju slučajeva potrebno je primeniti korekciju ukupne koncentracije u odnosu na endogeni nivo, što se i preporučuje u postojećim smernicama, ali dodatna istraživanja i preporuke za veći broj ovakvih preparata su neophodni za pravilan dizajn ovih studija bioekvivalencije. U literaturi se može naći manji broj radova u kojima je prikazana biofarmaceutska karakterizacija preparata koji sadrže analoge endogenih supstanci [68-71].

**Tabela 3.** Osnovni elementi završnog izveštaja studije bioekvivalencije [35]

Protokol studije	Uvod Podaci o ispitivanim preparatima Cilj i dizajn ispitivanja Etička razmatranja, saglasnost odgovarajućih tela Izbor ispitanika Postupak ispitivanja Bioanalitička metoda Podaci o uočenim neželjenim efektima Farmakokinetička i statistička analiza
Podaci o ispitanicima	Informisani pristanak Osiguranje ispitanika Demografski podaci Test liste Randomizaciona šema
Bioanalitička metoda	Opis metode Validacija metode Hromatogrami
Rezultati ispitivanja	Individualne i srednje vrednosti koncentracija sa vrednostima standardnih devijacija Grafički prikaz koncentracija u plazmi u funkciji vremena Individualne i srednje vrednosti farmakokinetičkih parametara Statistička analiza Procena odstupanja
Zaključak	Kratak zaključak o uspostavljenoj bioekvivalenciji ispitivanih preparata

## 2.2 Biofarmaceutski sistem klasifikacije lekova

Iako studije biološke raspoloživosti i biološke ekvivalentnosti predstavljaju najpouzdaniji način procene brzine i obima resorpcije lekovite supstance, ove studije su

i finansijski i vremenski zahtevne i nose određeni rizik za pojavu neželjenih efekata kod učesnika studije. Iz tih razloga je poslednjih 15 godina došlo do intenzivnog rada na razvoju metoda za *in vitro* procenu oslobađanja lekovite supstance iz preparata. Mogućnost korišćenja *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance iz lekovitih preparata (*Dissolution test*) kao zamene za *in vivo* studije biološke ekvivalencije uvedena je sa pojavom BCS sistema [72].

BCS definiše rastvorljivost i/ili permeabilnost kao ograničavajuće faktore koji utiču na resorpciju i na osnovu njih su lekovite supstance podeljene u 4 klase [72, 73] (tabela 4).

**Tabela 4.** Biofarmaceutski sistem klasifikacije lekova [72]

BCS klasa	Rastvorljivost	Permeabilnost
I	Visoka	Visoka
II	Niska	Visoka
III	Visoka	Niska
IV	Niska	Niska

Značaj poznavanja procesa rastvaranja leka *in vivo* u gastrointestinalnom traktu i njegove permeabilnosti kroz intestinalne membrane u fazi resorpcije je poznat još od sredine prošlog veka, ali je tek sa pojavom BCS sistema obezbeđen novi kvantitativni pristup sagledavanja ovih procesa. Uvođenje BCS sistema doprinelo je formiranju jedinstvene baze podataka, zasnovane na nizu eksperimentalnih i literaturnih vrednosti, koja olakšava donošenje odluka regulatornih agencija prilikom procene farmaceutskih preparata u cilju njihove registracije ili kod postregistracionih aktivnosti. Jedan od ciljeva BCS-a je određivanje klase lekova kod kojih biološka ekvivalencija može biti procenjena samo na osnovu *in vitro* rezultata, odnosno kod kojih je moguće izostavljanje odgovarajućih *in vivo* studija (*biowaiver*). Naime, definišući odnos između resorpcije, rastvorljivosti i brzine rastvaranja, moguće je identifikovati slučajeve kada se *in vitro* podaci o brzini rastvaranja mogu koristiti kao surogat za *in vivo* procenu biološke ekvivalencije. Tako je samo na osnovu uporedne analize profila brzine rastvaranja lekovite supstance iz ispitivanih preparata moguće dokazati terapijsku ekvivalentnost ispitivanog preparata sa referentnim preparatom. Iako je BCS razvijen

prvenstveno zbog regulatornih implikacija, ovaj pristup je našao primenu i u predkliničkoj i kliničkoj fazi razvoja leka [74, 75].

### 2.2.1 Kriterijumi za biofarmaceutsku klasifikaciju lekovitih supstanci

U skladu sa konceptom BCS sistema, glavni faktori koji utiču na proces resorpcije lekovitih supstanci nakon oralne primene preparata su rastvorljivost, odnosno brzina rastvaranja lekovite supstance iz farmaceutskog preparata, koji utiču na brzinu resorpcije i permeabilnost lekovite supstance, koja utiče na stepen resorpcije.

#### 2.2.1.1 Rastvorljivost

Kao kriterijum za klasifikaciju lekovitih supstanci u okviru BCS sistema koristi se minimalna rastvorljivost u medijumima čija pH vrednost odgovara fiziološkom rasponu pH vrednosti. Za jedinjenja tipa slabih baza ili slabih kiselina, to je, takozvana, osnovna rastvorljivost, koja predstavlja rastvorljivost nejonizovanog oblika supstance i u direktnoj je korelaciji sa njenom hemijskom strukturom. Osnovna rastvorljivost se može izračunati iz sledećih jednačina:

$$\log C_0 = -\log P - 1.11 \frac{\Delta S_f(mp - 25)}{1364} + 0.54 \quad [76]$$

$$\log C_0 = -0.01(mp - 25) - \log P + 0.5 \quad [77]$$

gde  $C_0$  predstavlja osnovnu rastvorljivost (mol/l),  $P$  je particioni koeficijent oktanol-voda,  $S_f$  predstavlja entropiju sistema i  $mp$  temperaturu topljenja ( $C^\circ$ ).

Međutim, rastvorljivost lekovite supstance se ne može razmatrati nezavisno od primenjene doze, ukoliko želimo da tačno procenimo njenu moć resorpcije. Johnson i Swindell su predložili 1966. godine relativno jednostavan pristup za procenu maksimalne doze koja će se u potpunosti resorbovati (*maximum absorbable dose*, MAD):

$$MAD = S \times K_a \times SIWV \times SITT \quad [78]$$

gde je  $S$  rastvorljivost (mg/ml) pri pH 6.5,  $K_a$  je konstanta brzine resorpcije ( $\text{min}^{-1}$ ),  $SIWV$  predstavlja zapreminu tečnosti u tankom crevu (ml) (250 ml) i  $SITT$  predstavlja vreme prolaza kroz tanko crevo, koje prosečno iznosi 3 sata. Na osnovu određivanja

MAD vrednosti može se pretpostaviti da li će lek ispoljiti probleme pri rastvaranju i resorpciji.

Kako količina lekovite supstance rastvorene *in vivo* zavisi od doze, ali i od zapremine tečnosti sa kojom se uzima lek, uveden je, takozvani, dozni broj  $D_0$ , koji predstavlja osnovu za podelu lekovitih supstanci na nisko i visoko rastvorljive u BCS sistemu:

$$D_0 = \frac{M_0}{V_0 C_0} \quad [72, 79]$$

gde  $M_0$  predstavlja maksimalnu terapijsku dozu lekovite supstance,  $V_0$  zapreminu tečnosti uzete sa lekom (jedna čaša vode, odnosno 250 ml) i  $C_0$  je minimalna rastvorljivost u fiziološkom rasponu pH vrednosti.

Lekovita supstanca se može smatrati visoko rastvorljivom ako je dozni broj manji od 1, a nisko rastvorljivom ako je dozni broj veći od 1 [72, 79]. Klasifikacija na osnovu rastvorljivosti se zasniva na najvećoj doznoj jačini primenjenog leka. U skladu sa FDA smernicom, vrši se određivanje profila rastvorljivosti u vodenim medijumima u opsegu pH vrednosti od 1 do 7.5, odnosno, po EMA smernici, u opsegu pH vrednosti od 1 do 6.8 [35, 80]. Supstanca se smatra dobro rastvorljivom ukoliko se u datom opsegu pH vrednosti najveća doza rastvara u 250 ml ili manje vodenog medijuma, odnosno pufera [35, 80].

Savremena dostignuća i razvoj biofarmacije poslednjih godina ukazuju da su trenutno važeći kriterijumi za BCS klasifikaciju lekovitih supstanci previše strogi i da ih je potrebno modifikovati [81-87]. Jedan od predloga je da opseg pH vrednosti u kome se određuje rastvorljivost treba da bude sužen tako da uključuje samo sledeće pH vrednosti: 1.2, 4.5 i 6.8. Kod amfoternih jedinjenja rastvorljivost treba da se odredi na izoelektričnoj tački, ako se ona nalazi između pH 1.2 i 6.8. Takođe, predlaže se uvođenje klase intermedijarno rastvorljivih lekovitih supstanci, uzimajući u obzir da mnoge supstance BCS klase II pokazuju dobru rastvorljivost na određenim vrednostima u pH opsegu 1 do 8. Tako bi ove supstance činile BCS IIa klasu, a supstance koje se ne bi rastvarale pri datom opsegu pH vrednosti činile bi BCS IIb klasu [82, 87]. Predlog je da se zapremina tečnosti koja se koristi za izračunavanje doznog broja poveća sa 250 ml na 500 ml, što je posebno prihvatljivo za pH vrednosti 4.5 i 6.8 koje odgovaraju tankom

crevu, iako je zapremina od 250 ml reprezentativna za oblast želuca [83]. Jedan od najvećih nedostataka predloženih kriterijuma je i to što se određivanje rastvorljivosti vrši u stanju ravnoteže, pri čemu se ne uzima u obzir dinamička priroda procesa resorpcije [87]. Ovaj nedostatak se može prevazići određivanjem osnovne brzine rastvaranja, kinetičke rastvorljivosti ili korišćenjem specijalnih *in vitro* sistema za predviđanje *in vivo* brzine rastvaranja [88-92].

### 2.2.1.2 Permeabilnost

Permeabilnost je, pored rastvorljivosti i brzine rastvaranja lekovite supstance iz farmaceutskog preparata, ključni faktor koji utiče na proces resorpcije lekovite supstance, i samim tim i ključni faktor za klasifikaciju supstanci u okviru BCS sistema. Lekovita supstanca se smatra visoko permeabilnom ukoliko je stepen resorpcije u ljudi veći od 85% [35], odnosno veći od 90% [80]. Pored visokog stepena resorpcije supstanca mora pokazivati i stabilnost u intestinumu, i mora biti poznat mehanizam transporta supstance kroz ćelijske membrane. Transcelularna permeabilnost neke supstance zavisi od odnosa njene rastvorljivosti u lipidnom sloju intestinalnih membrana i rastvorljivosti u vodenom medijumu [93, 94]. Ovo je okarakterisano sledećom jednačinom:

$$P_m = \frac{K_p}{D_m L_m} \quad [93]$$

gde je  $P_m$  koeficijent permeabilnosti,  $K_p$  particioni koeficijent oktanol-voda,  $D_m$  membranski difuzitet i  $L_m$  debljina membrane. Iz ove jednačine se može videti da će permeabilnost kroz neku membranu za određenu supstancu zavisiti od fluidnosti te membrane i particionog koeficijenta supstance. Tako je pokazano da supstance čiji je  $\log P$  manji od nule predstavljaju hidrofilne molekule koje imaju malu permeabilnost. Sa druge strane, supstance sa  $\log P$  većim od 3 su veoma lipofilne, što ograničava njihov transport kroz enterocite [93]. Supstance sa  $\log P$  u opsegu od 0 do 3 pokazuju najbolju resorpciju mehanizmom pasivne difuzije.

Metode za određivanje permeabilnosti mogu biti krajnje jednostavne, ali i veoma kompleksne. Permeabilnost se može odrediti matematičkim proračunom na osnovu hemijske strukture molekula, *in vitro* ispitivanjem uz korišćenje modela veštačkih



membrana, *in vitro* ispitivanjem na različitim kulturama ćelija (Caco-2 ćelije, MDCK ćelije), *in vitro* ispitivanjem na humanom ili animalnom intestinalnom tkivu, *in vivo* studijama intestinalne perfuzije u ljudi ili *in vivo* ili *in situ* studijama intestinalne perfuzije na animalnim modelima, kao i studijama u kojima se određuje apsolutna biološka raspoloživost i studijama balansa mase (*Mass Balance Studies*) [95-98].

Iako se određivanje permeabilnosti *in vivo* metodama na ljudima još uvek smatra najpouzdanijim načinom procene permeabilnosti, ovaj pristup zahteva dosta vremena i finansijskih sredstava, a dobijeni rezultati se odnose samo na deo intestinuma (jejunum). Iz tog razloga je proteklih godina došlo do intenzivnog razvoja različitih modela veštačkih membrana za procenu permeabilnosti lekovitih supstanci i različitih *in silico* metoda u kojima se predviđa permeabilnost na osnovu fizičko-hemijskih osobina molekula, vrednosti particionog koeficijenta i sposobnosti uspostavljanja vodoničnih veza [99, 100]. Posebnu pažnju treba posvetiti ako je supstanca supstrat za određene proteinske transportere i pokazuje aktivan transport kroz membranu [101, 102].

Kao i u slučaju rastvorljivosti, i kriterijumi za procenu permeabilnosti su zadnjih godina predmet diskusije i dodatnih razmatranja. Jedan od predloga je da se granična vrednost stepena resorpcije u ljudi koja ukazuje na visoku permeabilnost smanji na 85% umesto predloženih 90% [83]. Takođe se predlaže formiranje klase supstanci intermedijerne permeabilnosti, u kojoj bi se nalazile supstance koje pokazuju stepen resorpcije između 40% i 85% i koje bi se takođe mogle razmatrati za *biowaiver* [83].

### **2.2.1.3 Brzina rastvaranja lekovite supstance iz lekovitog preparata**

Brzina rastvaranja lekovite supstance iz lekovitog oblika je treći faktor koji, u skladu sa principima BCS-a, utiče na biološku raspoloživost lekovite supstance iz oralno primenjenog preparata. Kako neposredno određivanje *in vivo* brzine rastvaranja lekovite supstance iz farmaceutskog preparata nije moguće, *in vitro* test brzine rastvaranja (*Dissolution test*), ukoliko je adekvatno osmišljen, može oslikavati sudbinu supstance *in vivo* [103-105].

Test brzine rastvaranja se može koristiti za izbor optimalne formulacije u fazi razvoja lekovitog preparata, zatim za ispitivanje stabilnosti i kvaliteta gotovog proizvoda pri puštanju serije u promet, kao i u toku predloženog roka trajanja, za transfer (*scale-up*) tehnološkog procesa sa laboratorijskog na polupogonski i proizvodni

nivo, kontrolu serija u redovnoj proizvodnji i, u slučaju određenih postregistracionih promena, za procenu potrebe za izvođenjem nove studije bioekvivalencije [75]. Izvođenje testa brzine rastvaranja neophodno je za sve čvrste farmaceutske preparate kod kojih je resorpcija lekovite supstance uslov za ostvarivanje terapijskog delovanja. Test brzine rastvaranja je prvi put zvanično uveden u USP 18 1970. godine [106], a tokom godina su izdate i različite smernice od strane regulatornih agencija za lekove u Evropi i Americi koje se odnose na uslove izvođenja ovog testa (tabela 5). Međutim, većina ovih smernica daje samo opšte preporuke za izvođenje ovog testa. Za neke preparate u Američkoj farmakopeji se mogu naći u okviru monografija tačno propisani uslovi ispitivanja i zahtevi koji moraju biti ispunjeni [8], ali za veliki broj preparata uslovi nisu definisani.

Brzina rastvaranja lekovite supstance iz farmaceutskog preparata zavisi od njenih fizičko-hemijskih osobina i karakteristika samog preparata. Kako su glavni faktori koji utiču na *in vivo* brzinu rastvaranja u gastrointestinalnom traktu hidrodinamički uslovi koju tu vladaju i sastav, pH i zapremina gastrointestinalnih tečnosti, *in vitro* test brzine rastvaranja treba da bude tako dizajniran da što realnije odražava navedene *in vivo* uslove, kako bi se dobijeni rezultati mogli dovesti u korelaciju sa *in vivo* rezultatima. Ukoliko ovi uslovi nisu adekvatno reprodukovani *in vitro*, na osnovu testa brzine rastvaranja nije moguće tačno predvideti *in vivo* ponašanje preparata [114]. Dalje, *in vitro* test brzine rastvaranja koji se koristi za procenu bioekvivalentnosti dva preparata mora biti dovoljno diskriminativan, tako da ukaže samo na one suštinske razlike između profila brzine rastvaranja *in vitro* koje će se ispoljiti i *in vivo* između profila resorpcije ispitivanih preparata. Da bi test brzine rastvaranja bio diskriminativan, preparati moraju biti analizirani pod istim eksperimentalnim uslovima i dobijeni profili moraju na adekvatan način da oslikavaju *in vivo* ponašanje preparata. Ukoliko *in vitro* rezultati nisu u korelaciji sa *in vivo* profilima, onda uzrok ovog neslaganja mora biti ispitan [35].

Savremeni trendovi u razvoju metoda za ispitivanje brzine rastvaranja uključuju dizajn *in vitro* testova koji što vernije simuliraju *in vivo* uslove, kao i razvoj mehanističkih modela za uspostavljanje korelacije između *in vitro* i *in vivo* rezultata [115-117].

**Tabela 5.** Hronološki pregled regulatornih smernica vezanih za primenu *in vitro* testa brzine rastvaranja

1993	FDA Guidance for Industry: Oral Extended (Controlled) Release Dosage Forms in <i>In Vivo</i> Bioequivalence and <i>In Vitro</i> Dissolution Testing [107]
1995	FDA Guidance for Industry: Immediate-Release Solid Dosage Forms: Scale-Up and Postapproval Changes (SUPAC-IR): Chemistry, Manufacturing and Controls, <i>In Vitro</i> Dissolution Testing and <i>In Vivo</i> Bioequivalence Test Documentation [108]
1997	FDA Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms [109]
1997	FDA Guidance for Industry: Modified-Release Solid Dosage Forms: Scale-Up and Postapproval Changes (SUPAC-MR): Chemistry, Manufacturing and Controls, <i>In Vitro</i> Dissolution Testing and <i>In Vivo</i> Bioequivalence Documentation [110]
1997	FDA Guidance for Industry: Extended-Release Oral dosage Forms: Development, Evaluation and Application of <i>In Vitro/In Vivo</i> Correlation [111]
2000	FDA Guidance for Industry: Waiver of <i>In Vivo</i> Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System [80]
2003	FDA Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products-General Considerations [53]
2000	EMA Note for Guidance Specifications: Test procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical substances [112]
2010	EMA Guideline on the Investigation of Bioequivalence [35]
2012	EMA Draft Guideline on Oral Modified-Release Products [113]

### 2.2.2 Primena Biofarmaceutskog sistema klasifikacije lekova: *biowaiver*

Uvođenje Biofarmaceutskog sistema klasifikacije lekova omogućilo je, u određenim situacijama, korišćenje *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata kao zamene za *in vivo* studije bioekvivalencije [80]. Iako se *in vivo* studije smatraju nezamenljivim kada su u pitanju procena efikasnosti i bezbednosti primene nove lekovite supstance i ispitivanje kvaliteta preparata, ove studije, u eri brzog razvoja najsavremenijih tehnologija, imaju i veliki broj nedostataka. Danas, kada je za razvoj novog leka potrebno u proseku deset godina, a konkurencija je veoma velika, svaka mogućnost uštede na vremenu je bitna, pa je i sveprisutna tendencija i težnja za smanjenjem broja kliničkih studija, uz primenu *in vitro* i *in silico* metoda, potpuno razumljiva.

BCS sistem omogućava identifikaciju ključnih faktora koji mogu ograničiti proces resorpcije i izbor eksperimentalnih uslova i zahteva za test brzine rastvaranja, kao i procenu mogućnosti uspostavljanja *in vitro-in vivo* korelacije (IVIVK). U tabeli 6 je dat pregled karakteristika klasa lekova u okviru BCS sistema sa aspekta mogućnosti uspostavljanja IVIVK.

**Tabela 6.** Mogućnost uspostavljanja IVIVK u skladu sa BCS sistemom za lekovite preparate sa trenutnim oslobađanjem lekovite supstance [72]

BCS klasa	Ograničavajući faktor za resorpciju	Mogućnost uspostavljanja IVIVK
I	brzina pražnjenja želuca	IVIVK moguća ako je brzina rastvaranja manja od brzine pražnjenja želuca
II	brzina rastvaranja	IVIVK moguća ako su brzine rastvaranja <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> slične, osim ako doza nije veoma visoka
III	permeabilnost	IVIVK ograničena ili nemoguća
IV	brzina rastvaranja i permeabilnost	IVIVK ograničena ili nemoguća

Za lekove klase I BCS sistema se očekuje dobra resorpcija, osim ako su nestabilni unutar gastrointestinalnog trakta, ako grade nerastvorljive komplekse ili podležu

metabolizmu prvog prolaza [47]. Resorpcija ove klase lekova, primenjenih u obliku preparata sa trenutnim oslobađanjem, ne zavisi od brzine rastvaranja i vremena prolaska kroz gastrointestinalni trakt i regulisana je samo brzinom pražnjenja želuca, zbog čega se ne očekuje uspostavljanje korelacije sa brzinom rastvaranja [72]. Test brzine rastvaranja za preparate ove klase BCS sistema treba da pokaže da se lek zaista brzo oslobađa iz preparata u vodenom medijumu.

Resorpcija lekova BCS klase II je ograničena brzinom rastvaranja *in vivo*, osim ako doza nije previsoka, i obično je sporija nego kod lekova BCS klase I. Profil brzine rastvaranja kod ove klase mora biti definisan većim brojem vremenskih tačaka i uz upotrebu više medijuma, uključujući i biorelevantne medijume. Ova klasa lekova može pokazivati varijabilnu resorpciju, zbog mnogobrojnih *in vivo* faktora, kao i faktora formulacije, koji mogu uticati na brzinu rastvaranja [87, 118, 119].

Klasa III BCS sistema pokazuje resorpciju ograničenu permeabilnošću, zbog čega je brzo rastvaranje praktično i poželjno da bi se povećalo vreme kontakta između rastvorenog leka i površine za resorpciju. Kod ovih lekova i brzina i stepen resorpcije mogu biti varijabilni, ali se smatra da, ako su ispunjeni zahtevi za veoma brzo rastvaranje (najmanje 85% lekovite supstance za 15 minuta), ova varijabilnost neće biti posledica faktora formulacije, već fizioloških faktora [120-122].

Lekovi klase IV BCS sistema imaju nisku rastvorljivost i permeabilnost i predstavljaju pravi problem pri formulaciji preparata za oralnu primenu.

Osnovni princip biološke ekvivalentnosti je da sličnost profila koncentracija leka u funkciji vremena za test i referentni preparat podrazumeva i sličnost u terapijskom efektu, usled čega je moguća njihova zamenljivost u kliničkoj praksi. Sa druge strane, sličnost *in vitro* profila brzine rastvaranja ispitivanih preparata ukazuje na sličnost njihovih *in vivo* profila brzine rastvaranja, a time i na sličnost dispozicije leka u organizmu. Na osnovu ovoga, a u skladu sa konceptima BCS sistema, može se pretpostaviti da je, za pojedine lekove, moguće na osnovu *in vitro* profila brzine rastvaranja predvideti profil resorpcije leka u organizmu, što omogućava izostavljanje odgovarajuće *in vivo* studije (*biowaiver*).

FDA je prva regulatorna agencija koja je prihvatila *biowaiver* koncept prilikom stavljanja u promet generičkih lekova, čime je potvrđen praktični značaj BCS sistema [80]. Prema propisima FDA, izostavljanje *in vivo* ispitivanja biološke raspoloživosti ili

biološke ekvivalencije je prihvatljivo za preparate sa trenutnim oslobađanjem koji sadrže dobro rastvorne i visoko permeabilne supstance (BCS klasa I) i koji pokazuju brzo rastvaranje *in vitro* (najmanje 85% za 30 minuta), pri čemu prisutni ekscipijensi u formulaciji ne smeju uticati na proces resorpcije, a supstanca ne sme biti lek uskog terapijskog indeksa [80]. Očekuje se da male razlike u brzini rastvaranja neće kod ovih lekova imati značajan uticaj na  $C_{max}$  i PIK i da će se konvencionalni preparati sa trenutnim oslobađanjem ponašati *in vivo* kao oralni rastvori. Dalji razvoj i usavršavanje *biowaiver* koncepta tokom godina pokazali su da su uslovi dati u FDA smernici veoma strogi i da postoji mogućnost proširenja ovog koncepta i na druge klase lekova [82, 83, 118-122]. Kod lekova klase III kandidati za *biowaiver* mogu biti oni koji se nalaze u obliku preparata sa trenutnim oslobađanjem lekovite supstance u čijem se sastavu nalaze konvencionalni ekscipijensi i koji pokazuju veoma brzo rastvaranje *in vitro* (najmanje 85% za 15 minuta); lek ne sme biti supstrat za transportne proteinske pumpe koje se nalaze u zidu creva i ne sme da podleže metabolizmu prvog prolaza. Neki autori smatraju da slabe kiseline BCS klase II takođe mogu biti kandidati za *biowaiver* [87, 118, 123]. Ovi lekovi pokazuju malu rastvorljivost samo u želucu, dok je rastvorljivost pri višim pH vrednostima u oblasti intestinuma dobra, pa se tako za obim resorpcije (PIK) u ovom delu gastrointestinalnog trakta ne očekuje da bude osetljiv na manje razlike u brzini rastvaranja, za razliku od  $C_{max}$ , koji može ispoljiti veliku varijabilnost. Kod ove klase lekova brzina rastvaranja predstavlja ograničavajući faktor za resorpciju i postoji velika mogućnost uspostavljanja IVIVK, što može opravdati izostavljanje *in vivo* ispitivanja [116, 117]. U nedavno objavljenoj smernici EMA za ispitivanje biološke ekvivalentnosti lekova, *biowaiver* je pored lekova klase I, moguć i za lekove BCS klase III, ako su ispunjeni odgovarajući uslovi [35]. Lek klase III mora biti u obliku preparata sa trenutnim oslobađanjem koji pokazuje veoma brzo rastvaranje *in vitro* (najmanje 85% za 15 minuta) u medijumima pH vrednosti 1.2, 4.5 i 6.8, pri čemu upotrebljeni ekscipijensi moraju biti isti i u veoma sličnom kvantitativnom odnosu kod obe formulacije. Svetska zdravstvena organizacija (*World Health Organization, WHO*) daje preporuke za ekstenziju *biowaiver* koncepta za lekove BCS klase III, pri čemu takođe i ispitivani i referentni preparat moraju pokazati veoma brzo rastvaranje, kao i za lekove BCS klase II tipa slabih kiselina, pri čemu odnos doza-rastvorljivost mora biti manji ili jednak 250 ml pri pH 6.8, ispitivani preparat pokazuje brzo rastvaranje pri pH

6.8 i pri čemu je ostvarena sličnost profila brzine rastvaranja sa referentnim preparatom pri pH 1.2, 4.5 i 6.8 [124].

Na inicijativu Međunarodne farmaceutske organizacije (*International Pharmaceutical Federation, FIP*) od 2004. godine počelo je objavljivanje *biowaiver* monografija supstanci, sa ciljem da se sakupe svi dostupni podaci iz literature koji su neophodni za donošenje odluke da li *in vitro* test brzine rastvaranja može biti korišćen umesto studije bioekvivalencije [125]. Prilikom izrade monografije moraju biti uzeti u obzir svi faktori i kriterijumi koji su navedeni u smernici WHO (*Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for WHO Model List of Essential Medicines immediate-release, solid oral dosage forms*) [126]. Monografija treba da sadrži podatke o fizičko-hemijskim karakteristikama leka (rastvorljivost, pKa, logP, polimorfizam, građenje soli), dostupne podatke o permeabilnosti (intestinalna permeabilnost, permeabilnost na kulturama ćelija, stepen biološke raspoloživosti), dostupne podatke o studijama bioekvivalencije, moguće interakcije sa hranom i ekscipijensima, literaturne i eksperimentalne podatke o poređenju profila brzine rastvaranja, terapijske indikacije i terapijski indeks leka. Ove monografije nemaju regulatorni status, već predstavljaju skup trenutno najboljih dostupnih stručnih mišljenja, i veoma su značajne jer omogućavaju i kritičku procenu trenutno važećih kriterijuma za BCS klasifikaciju lekovitih supstanci. Do sada je objavljeno oko 40 monografija različitih lekovitih supstanci (paracetamol, atenolol, cimetidin, ibuprofen, verapamil...) koje imaju veliki značaj, jer se na osnovu prikaza biofarmaceutskih karakteristika i stručnih mišljenja na jednom mestu može značajno skratiti postupak donošenja odluke regulatornih organa o prihvatanju *biowaiver* koncepta u različitim fazama životnog ciklusa leka.

### 3 IN SILICO MODELI ZA PREDVIĐANJE RESORPCIJE

Identifikacija kinetike procesa rastvaranja lekovite supstance *in vivo* i procesa resorpcije predstavlja ključni korak u biofarmaceutskoj karakterizaciji preparata. Resorpcija leka nakon oralne primene veoma je kompleksan proces i, iako je u velikom broju slučajeva moguće primeniti klasičnu farmakokinetičku analizu (Wagner-Nelson i Loo-Riegelman metode) [127, 128], u određenim slučajevima resorpcija ipak ne može biti procenjena na ovaj način. Iz tog razloga je u poslednje vreme došlo do intenzivnog razvoja *in silico* modela za simulaciju procesa resorpcije leka, koji sve više nalaze primenu u fazi razvoja novih lekova i regulatornim razmatranjima [129-131].

Jedan od prvih koncepata sagledavanja resorpcije leka koji i danas predstavlja osnovu za razumevanje ovog procesa je hipoteza pH-zavisne raspodele. Po ovoj hipotezi, samo nejonizovani oblik molekula koji ima sposobnost jonizacije će se resorbovati kroz membranu gastrointestinalnog trakta [132, 133]. Frakcija resorbovanog leka zavisi od pKa supstance i pH sredine na mestu resorpcije. Iako je ovim konceptom proces resorpcije dosta pojednostavljen, na osnovu ovog modela su shvaćeni osnovni aspekti resorpcije. Ho i saradnici su razvili jedan od prvih modela za simuliranje resorpcije leka na bazi transporta putem pasivne difuzije kroz membrane gastrointestinalnog trakta [134-136]. Ovaj model je predstavljao prvi primer mehanističke interpretacije procesa resorpcije, ali zbog složenosti sama metodologija nije široko primenjivana. Osamdesetih godina prošlog veka pojavio se model mešajućih rezervoara (*mixing tank model*) koji spada u prve dinamičke modele za predviđanje resorpcije [137]. U ovom modelu je izvršena segmentacija digestivnog trakta na jedan ili seriju rezervoara koji imaju linearnu kinetiku transfera i njegova osnovna karakteristika je jednostavnost i mogućnost povezivanja sa farmakokinetičkim modelima. Takođe, ovaj model se može smatrati pretečom prostornih (kompartmentalnih) mehanističkih modela, koji danas imaju najveću primenu.

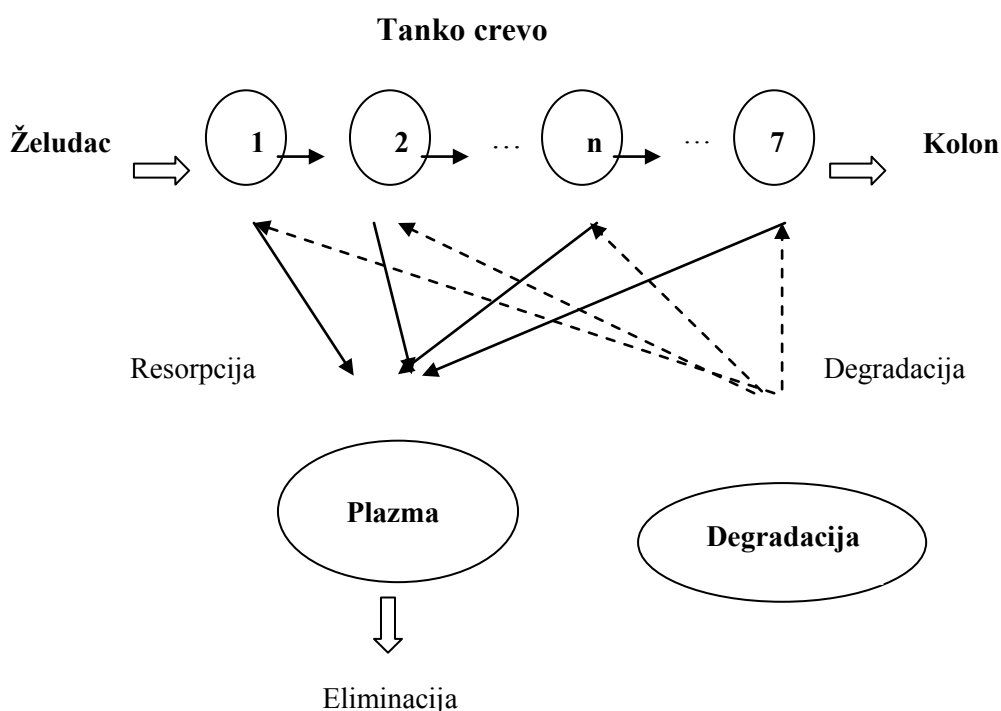
#### 3.1 Prostorni resorpcioni modeli

Prostorni modeli za predviđanje resorpcije leka spadaju u dinamičke matematičke modele koji sa velikom tačnošću opisuju tranzit i resorpciju leka kroz različite segmente gastrointestinalnog trakta [138].



### 3.1.1 Prostorni model resorpcije i tranzita

Prostorni model resorpcije i tranzita (*Compartmental Absorption and Transit Model*, CAT) je razvijen od strane Yu i saradnika, nakon analize vremena tranzita u tankom crevu za 400 različitih supstanci, da bi se tačno definisao prihvatljiv broj prostora koji će omogućiti tačno predviđanje procesa resorpcije [139]. Vrednosti vremena tranzita su ispoljavale log normalnu distribuciju i upoređene su sa stvarnim vrednostima procenta doze leka koja dospeva u kolon. Pokazano je da je podela tankog creva na sedam prostora najrelevantnija. U dobijenom sedmoprostornom modelu tankog creva prva polovina prvog prostora predstavljala je duodenum, druga polovina prvog zajedno sa drugim i trećim prostorom zajedno jejunum, a preostali prostori su odgovarali ileumu (slika 4) [139, 140].



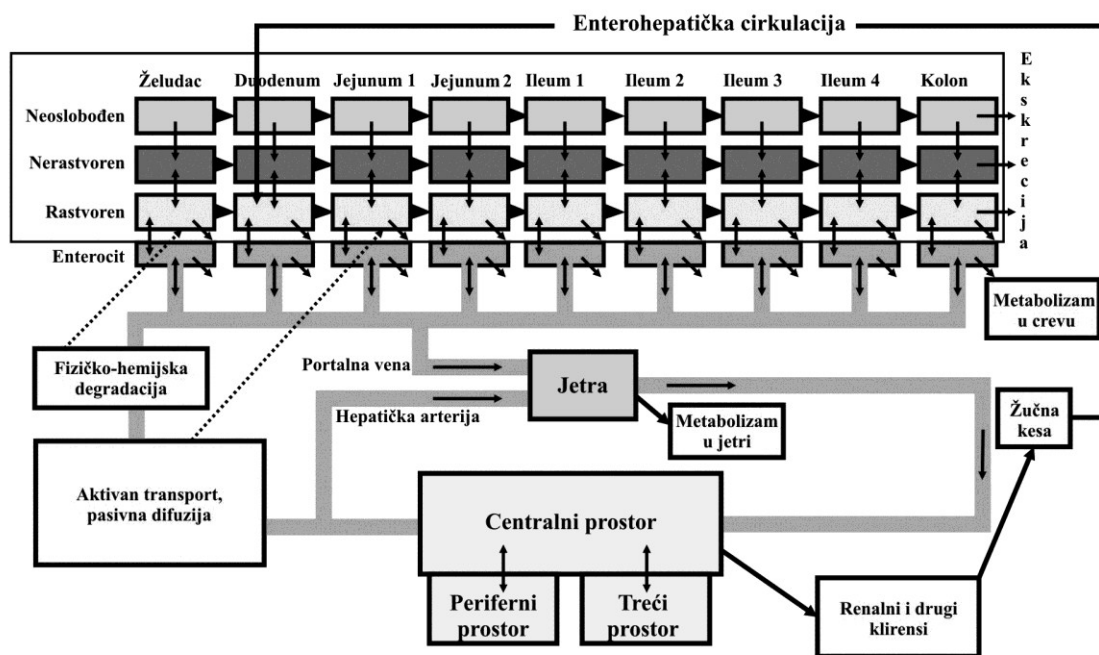
**Slika 4.** Šematski prikaz prostornog modela resorpcije i tranzita [139]

CAT model je definisan nizom diferencijalnih jednačina koje opisuju tranzit rastvorenog leka i njegovu resorpciju u različitim prostorima gastrointestinalnog trakta, pri čemu se određivanje konstante brzine resorpcije za svaki prostor vrši na osnovu

vrednosti koeficijenta permeabilnosti za taj prostor. U CAT modelu tanko crevo je podeljeno na sedam prostora sa jednakim vremenima tranzita, pri čemu se model bazira na pretpostavkama da se resorpcija leka odvija samo pasivnom difuzijom, da su konstante brzine tranzita u svih sedam segmenata tankog creva jednake i da je obim resorpcije u želucu i kolonu zanemarljiv [139].

### 3.1.2 Unapređeni prostorni model resorpcije i tranzita

Unapređeni prostorni model resorpcije i tranzita (*Advanced Compartmental Absorption and Transit Model*, ACAT) je razvijen na bazi CAT modela, koji je proširen time što su u obzir uzeti svi faktori koji nisu razmatrani u osnovnoj verziji CAT modela (brzina rastvaranja, resorpcija u želucu ili kolonu, pH-zavisna rastvorljivost, efekat prvog prolaza, mogućnost degradacije u gastrointestinalnom traktu, resorpcija iz preparata sa modifikovanim oslobađanjem) (slika 5) [140].



Slika 5. Šematski prikaz strukture ACAT modela [140]

I kod ACAT modela je osnovna pretpostavka da će tokom tranzita lek imati ista vremena tranzita u svih sedam prostora tankog creva. Kako je količina tečnosti koja dnevno uđe u prostor tankog creva (8-9 litara) veća nego količina koja izađe (0.5-1 litar), da bi se zadovoljila osnovna pretpostavka da su vremena tranzita jednaka,

volumeni i konstante brzine u gornjim prostorima tankog creva su veće nego u nižim delovima. Ovaj model je zasnovan na postojanju šest različitih oblika lekovite supstance (neoslobodena, nerastvorena, rastvorena, degradirana, metabolizovana i resorbovana), osamnaest prostora (želudac, sedam segmenata tankog creva, kolon i devet segmenata enterocita) i tri oblika ekskretovanog materijala (neoslobodan, nerastvoren i rastvoren) [138, 140]. Ukupna količina resorbovanog leka izračunava se integracijom količina koje se sukcesivno resorbuju i ekskretuju iz odgovarajućih regiona gastrointestinalnog trakta. Prednost ACAT modela u odnosu na originalnu verziju CAT modela je što je tranzit lekovite supstance u većoj meri u skladu sa fiziologijom gastrointestinalnog trakta i realnim *in vivo* uslovima, jer uzima u obzir kretanje leka u dva smera, iz i ka lumenu intestinuma, što nije bio slučaj kod CAT modela. Konačna koncentracija rastvorene lekovite supstance u lumenu gastrointestinalnog trakta rezultat je 1) ulaska lekovite supstance u odgovarajući prostor, 2) izlaska lekovite supstance iz prostora, 3) oslobađanja lekovite supstance iz primenjenog farmaceutskog preparata u odgovarajućem prostoru, 4) rastvaranja, odnosno precipitacije čestica lekovite supstance, 5) luminalne degradacije i 6) resorpcije/eksorpcije lekovite supstance. Svaki od ovih procesa opisan je odgovarajućom konstantom brzine [138].

Komercijalna verzija ACAT modela integrisana je u *GastroPlus<sup>TM</sup>* softveru, koji za predviđanje resorpcije zahteva niz ulaznih podataka koji predstavljaju fizičko-hemijske (molekulska masa, rastvorljivost, veličina i gustina čestica, permeabilnost), farmaceutsko-tehnološke (doza, farmaceutski oblik), fiziološke (dužina i prečnik prostora, vreme tranzita, pH, metabolizam prvog prolaza) i farmakokinetičke parametre (farmakokinetički model, klirens, volumen distribucije, procenat slobodnog leka, konstante brzine raspodele) [140].

Pomoću ACAT modela u okviru ovog programskog paketa moguće je, na osnovu navedenih ulaznih parametara, *in silico* simulirati resorpciju lekovitih supstanci kod ljudi, kao i kod nekih životinjskih vrsta i proceniti faktore koji utiču na resorpciju. Dalje, moguće je sprovesti virtuelne studije biološke raspoloživosti i biološke ekvivalencije, na izabranom broju ispitanika (maksimalno 2500), kao i simulaciju hrana-lek i lek-lek interakcija u toku resorpcije [140]. Pomoću *GastroPlus<sup>TM</sup>* softvera je moguće i uspešno simulirati nelinearnu Michaelis-Mentenovu kinetiku metabolizma i transporta, pri čemu se kao ulazni podaci koriste *in vitro* određene vrednosti aktivnosti

enzima i transportnih proteina ( $V_{max}$ ,  $K_m$ ). Takođe, mogu se proceniti uticaji interindividualnih varijacija farmakokinetičkih i fizioloških faktora na resorpcione profile, kao i odrediti biorelevantni kriterijumi za test brzine rastvaranja lekovite supstance. Za uspešnu simulaciju navedenih procesa, od ključnog značaja je odabir adekvatnih ulaznih podataka, jer i male varijacije u njihovim vrednostima mogu značajno da utiču na krajnji rezultat simulacija. Zbog toga je preporučljivo koristiti optimizacioni modul koji postoji u okviru softvera (*Optimization modul*), a koji omogućava optimizaciju vrednosti unetih parametara, kako bi rezultati simulacije bili što približniji realnim *in vivo* podacima.

Važna karakteristika ACAT modela u okviru *GastroPlus<sup>TM</sup>* programa je sposobnost izračunavanja konstante brzine resorpcije leka ( $K_a$ ) u skladu sa regionalnom promenom permeabilnosti leka kroz membranu. Izračunavanje njene vrednosti se vrši pomoću modula *Optimal logD*, množenjem jejunalne efektivne permeabilnosti i resorpcionog faktora proporcionalnosti (*Absorption Scale Factor*, ASF) specifičnog za svaki prostor u okviru modela.

U literaturi se može naći veći broj radova u kojima je prikazana uspešna simulacija resorpcije lekovitih supstanci koje pripadaju različitim grupama BCS-a, pri čemu su dobijeni rezultati, zajedno sa rezultatima IVIVK komentarisani i u skladu sa mogućnostima primene *biowaiver*-a za pojedine supstance [84, 116, 117]. Radovi u kojima se kvantitativno opisuju i ostali farmakokinetički procesi (raspodela, metabolizam i ekskrecija), kao i farmakodinamički efekti, takođe su prisutni u literaturi [141-144].

### **3.2 *In vitro-in vivo* korelacija**

Uspostavljanje *in vitro-in vivo* korelacije (IVIVK) ima za cilj povezivanje ponašanja leka uočenog *in vitro* sa njegovim *in vivo* zapaženim biofarmaceutsko-farmakokinetičkim karakteristikama. Osnovi cilj uspostavljanja IVIVK je korišćenje *in vitro* testa brzine rastvaranja kao zamene za *in vivo* studije biološke raspoloživosti, odnosno biološke ekvivalencije. Korelacije su obično linearne, ali nelinearne korelacije su takođe moguće [145]. Na osnovu uspostavljene IVIVK moguće je, u određenim situacijama, kao što je rad na razvoju formulacije preparata sa modifikovanim oslobađanjem ili sprovođenje postregistracionih izmena u sastavu formulacije,

proizvodnoj opremi ili mestu proizvodnje, predvideti *in vivo* ponašanje preparata samo na osnovu rezultata dobijenih *in vitro* ispitivanjem brzine oslobađanja, bez izvođenja ponovljenih *in vivo* ispitivanja [111, 146]. Ovakav pristup ima za cilj smanjenje ukupnih troškova vezanih za farmakokinetičke studije. Uspostavljanje IVIVK se može očekivati ukoliko je oslobađanje lekovite supstance ograničavajući korak u procesu resorpcije, što je u skladu sa konceptom BCS sistema, po kome se uspostavljanje IVIVK prvenstveno očekuje za lekove koji pripadaju BCS klasi II [72]. Pored toga, razvoj IVIVK se može očekivati ako *in vitro* metoda brzine rastvaranja na reprezentativan način odražava *in vivo* rezultate, odnosno ako je biorelevantna [147, 148].

Između *in vitro* i *in vivo* podataka moguće je, u skladu sa smernicama FDA, uspostaviti pet nivoa korelacije, koji u različitom stepenu omogućavaju predviđanje *in vivo* profila oslobađanja:

- korelacija nivoa A;
- korelacija nivoa B;
- korelacija nivoa C;
- višestruka korelacija nivoa C;
- korelacija nivoa D [111].

Korelacija nivoa A predstavlja najviši nivo korelacije i uspostavljanje ovog nivoa ukazuje da se *in vitro* test brzine rastvaranja može koristiti kao zamena za *in vivo* ispitivanja. Ostali nivoi korelacije imaju manji značaj i ne mogu da se koriste kao osnova za podnošenje zahteva za dobijanje dozvole za *biowaiver*, osim u slučaju višestruke korelacije nivoa C, koja predstavlja uspostavljanje kvantitativnog odnosa između jednog ili više farmakokinetičkih parametara i količine rastvorene lekovite supstance *in vitro* u različitim vremenskim intervalima [111]. Uspostavljanje ovog nivoa IVIVK u većini slučajeva ukazuje i na postojanje IVIVK nivoa A.

### **3.2.1 *In vitro-in vivo* korelacija nivoa A**

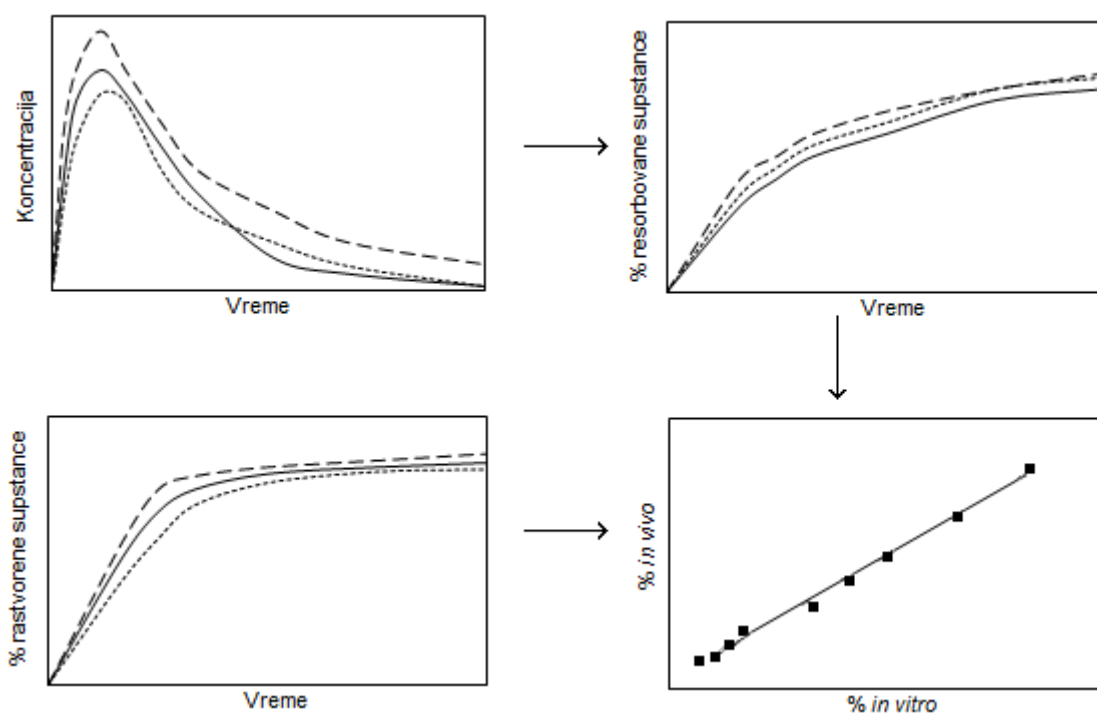
Korelacija nivoa A se odnosi na uspostavljanje veze između celokupnog *in vitro* profila brzine rastvaranja i *in vivo* profila koncentracije leka u organizmu, odnosno, na uspostavljanje korelacije "od tačke do tačke" (slika 6). Ukoliko između količine rastvorene supstance u toku vremena *in vitro* i količine rastvorene, odnosno,

resorbovane supstance u toku vremena *in vivo* postoji linearan odnos 1:1, između datih podataka postoji korelacija nivoa A [111]. Da bi se uspostavila korelacija nivoa A koja bi bila prihvaćena od strane regulatornih organa u svrhu *biowaiver*-a, ovaj model korelacije mora biti validiran i razvijen na najmanje 3 formulacije različitih brzina rastvaranja [111]. U literaturi se mogu naći i primeri uspostavljanja IVIVK nivoa A za samo jednu formulaciju [149-151]. Iako ovakvi modeli nemaju regulatorni značaj, oni mogu značajno doprineti razvoju relevantnog testa brzine rastvaranja i mogu dodatno biti prošireni u pravu IVIVK nivoa A. Kako profil *in vivo* brzine rastvaranja nije moguće direktno meriti, za njegovu procenu koriste se različiti matematički modeli izračunavanja. Prilikom uspostavljanja IVIVK moguće je primeniti, takozvani, dekonvolucionni ili konvolucionni pristup.

U dekonvolucionom pristupu *in vivo* profil brzine rastvaranja se procenjuje indirektno, na osnovu podataka o koncentraciji leka u plazmi nakon oralne i intravenske primene preparata [152]. Rezultati dobijeni primenom ovog pristupa predstavljaju količinu lekovite supstance koja je resorbovana i koja se poistovećuje sa količinom supstance koja je rastvorena *in vivo*, pod uslovom da permeabilnost nije ograničavajući faktor za resorpciju. Dalje se procenat leka resorbovanog *in vivo* poredi sa procentom leka oslobođenim *in vitro*. Najčešće se za dekonvoluciju *in vivo* profila koriste Wagner-Nelson i Loo-Riegelman jednačina [127, 128]. Wagner-Nelson metoda se koristi za one lekove čija se farmakokinetika može opisati jednodimenzionalnim modelom i njena prednost je što od *in vivo* podataka zahteva samo profil zavisnosti koncentracije leka u funkciji vremena nakon oralne primene. Loo-Riegelman metoda je bazirana na dvodimenzionalnom modelu i zahteva i podatke nakon intravenske primene leka, što ograničava njenu primenu. Nedostatak dekonvolucionog pristupa je, pored toga što zahteva primenu referentnog preparata, i to da količine leka koje su se resorbovale i rastvorile *in vivo* nije uvek moguće poistovetiti. U slučaju lekovitih supstanci kod kojih na resorpciju, pored brzine rastvaranja, utiču i različiti transportni proteini ili kod kojih postoji presistemski metabolizam u zidu creva, količine supstance resorbovane i rastvorene *in vivo* se razlikuju, što otežava uspostavljanje IVIVK [153].

U konvolucionom pristupu vrši se poređenje *in vivo* uočenog profila koncentracije lekovite supstance u plazmi u toku vremena sa profilom koncentracije predviđenim na osnovu podataka dobijenih *in vitro* testom brzine rastvaranja [152]. Prednost ove

metode je što ne zahteva primenu referentnog preparata, pri čemu se, kao i kod dekonvolucionog pristupa podrazumeva da je sistem linearan. Poslednjih godina je došlo do razvoja konvolucionih metoda u okviru određenih simulacionih softvera, pomoću kojih se preko sistema diferencijalnih jednačina konvoluiraju profili *in vitro* brzine rastvaranja i predviđaju profili koncentracije u plazmi, bez izvođenja direktne korelacije između *in vivo* i *in vitro* profila brzine rastvaranja [154].



**Slika 6.** Šematski prikaz uspostavljanja *in vitro-in vivo* korelacije

### 3.2.2 Primena *in vitro-in vivo* korelacije

IVIVK može biti od velikog značaja u ranim fazama razvoja leka, kada ispitivanje odnosa između *in vitro* i *in vivo* ponašanja leka u animalnim i *in vitro* modelima omogućava izbor najoptimalnije formulacije u pogledu kvaliteta, efikasnosti i bezbednosti [155, 156].

Uspostavljanje IVIVK u toku razvoja lekovitog preparata omogućava korišćenje *in vitro* testa brzine rastvaranja kao zamene za studije biološke raspoloživosti, odnosno bioekvivalencije, što se dalje koristi za dobijanje dozvole za promet na osnovu *biowaiver*-a i definisanje biorelevantnih zahteva za test brzine rastvaranja.

U slučajevima kada je nakon dobijanja dozvole za stavljanje leka u promet neophodno da dođe do nekih manjih izmena u formulaciji, promena opreme ili proizvodnog procesa, uspostavljanje IVIVK može poslužiti da se izbegne sprovođenje nove studije bioekvivalencije, poređenjem profila brzine rastvaranja izmenjene i referentne formulacije. Do sada je *biowaiver* zasnovan na primeni IVIVK odobren samo za preparate sa modifikovanim oslobađanjem [111, 157, 158], mada se očekuje da će se ovaj koncept proširiti i na preparate sa trenutnim oslobađanjem [159, 160].

Na osnovu IVIVK moguće je definisati i zahteve za brzinu rastvaranja koje je potrebno zadovoljiti *in vitro* da bi se osigurao odgovarajući kvalitet preparata. Razvoj IVIVK omogućava korišćenje *in vitro* testa brzine rastvaranja za predviđanje *in vivo* ponašanja formulacije, pri čemu biorelevantni zahtevi za brzinu rastvaranja minimiziraju mogućnost puštanja u promet serija koje neće imati željeno *in vivo* ponašanje. Način uspostavljanja zahteva za brzinu rastvaranja na osnovu IVIVK iz farmaceutskih preparata sa modifikovanim oslobađanjem za oralnu primenu detaljno je opisan u smernici FDA [111].

Koncept IVIVK se može primeniti i na lekovite oblike za parenteralnu primenu (implanti, sistemi sa kontrolisanim oslobađanjem), ali ovaj pristup nije do sada široko primenjivan [161, 162].



# CILJ RADA

Opšti cilj rada je biofarmaceutska karakterizacija razvojne formulacije tableta sa trenutnim oslobađanjem levotiroksin-natrijuma i razvoj biorelevantnog testa za ispitivanje brzine rastvaranja kroz izvođenje odgovarajućih *in vivo*, *in vitro* i *in silico* studija.

Cilj *in vitro* studije je:

- procena uticaja pH vrednosti medijuma na rastvorljivost levotiroksin-natrijuma;
- procena uticaja primenjenih eksperimentalnih uslova na brzinu rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz tableta;
- poređenje profila brzine rastvaranja aktivne supstance iz različitih preparata.

Cilj *in vivo* studije je:

- ispitivanje relativne biološke raspoloživosti test formulacije tableta sa levotiroksin-natrijumom u odnosu na referentni preparat;
- identifikacija kinetike resorpcije leka;
- procena uticaja metode korekcije koncentracije levotiroksina u odnosu na endogeni nivo na uspostavljanje bioekvivalencije.

Cilj *in silico* studije je:

- razvoj lek-specifičnog resorpcionog modela koji omogućava predviđanje profila koncentracije leka u krvi i identifikaciju kritičnih fizičko-hemijskih, farmakokinetičkih i farmaceutsko-tehnoloških faktora koji određuju brzinu i obim resorpcije levotiroksina;
- ispitivanje uticaja različitih brzina rastvaranja na profil koncentracije levotiroksina u plazmi, kao i utvrđivanje biorelevantne specifikacije brzine rastvaranja;
- uspostavljanje odgovarajućeg modela *in vitro-in vivo* korelacije;
- kritička analiza mogućnosti primene *biowaiver* koncepta.

# **EKSPERIMENTALNI DEO**

## 4 MATERIJALI I METODE

U ovom poglavlju su navedeni materijali i opšte metode i ispitivanja koja su korišćena u eksperimentalnom radu.

### 4.1 *IN VITRO* ISPITIVANJE

#### 4.1.1 Materijali

Za ispitivanje rastvorljivosti korišćen je levotiroksin-natrijum u obliku mikroniziranog praška (proizvođač Peptido GmbH, Nemačka).

##### 4.1.1.1 Uzorci tableta

Za ispitivanje brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz tableta sa trenutnim oslobađanjem korišćeni su uzorci tableta a) prvobitne formulacije generičkog preparata, b) razvojne (optimizovane) formulacije, c) referentnog preparata i d) komercijalno dostupnog uporednog generičkog preparata. Podaci o ispitivanim preparatima prikazani su u tabeli 7, dok je pregled pomoćnih supstanci koje ulaze u sastav ispitivanih preparata dat u tabeli 8.

**Tabela 7.** Podaci o ispitivanim preparatima

Preparat	prvobitna formulacija	razvojna formulacija	referentni preparat	uporedni preparat
oznaka	T1	T2	R	G
lekoviti oblik	tablete	tablete	tablete	tablete
jačina	100 µg	100 µg	100 µg	100 µg

**Tabela 8.** Pregled pomoćnih supstanci koje ulaze u sastav ispitivanih preparata

Preparat	Pomoćna supstanca
T1	kukuruzni skorb, kalcijum-hidrogenfosfat, mikrokrystalna celuloza, povidon K-25, natrijum-skorboglikolat, magnezijum-stearat, propilenglikol, limunska kiselina
T2	kukuruzni skorb, laktoza, želatina, kroskarmeloza-natrijum, magnezijum-stearat
R	kukuruzni skorb, laktoza, želatina, kroskarmeloza-natrijum, magnezijum-stearat
G	kalcijum-hidrogenfosfat, mikrokrystalna celuloza, natrijum-skorboglikolat, dekstrin, delimično zasićeni gliceridi

#### 4.1.1.2 Medijumi za ispitivanje rastvorljivosti i brzine rastvaranja

Za pripremu medijuma za ispitivanje rastvorljivosti i brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma korišćeni su rastvori pufera pripremljeni u skladu sa zahtevima odgovarajućih farmakopeja. Sastav korišćenih medijuma je prikazan u tabeli 9.

Za pripremu medijuma korišćene su sledeće supstance: natrijum-laurilsulfat (Sigma, USA), hlorovodonična kiselina (Merck, Nemačka), kalijum-hlorid (JT Baker, Holandija), glacijalna sirćetna kiselina (Merck, Nemačka), kalijum-dihidrogenfosfat (JT Baker, Holandija), natrijum-acetat (JT Baker, Holandija), natrijum-hidroksid (Merck, Nemačka). Sve supstance se bile odgovarajućeg stepena čistoće (p.a).

**Tabela 9.** Sastav medijuma korišćenih u eksperimentalnom radu

Vrsta medijuma	Sastav u 1 l medijuma
hidrohloridni medijum pH 1.2*	3.7 g KCl i 85 ml 1 mol/l HCl
hidrohloridni medijum pH 3.0	3.7 g KCl, podešavanje pH sa 1 mol/l HCl
acetatni pufer pH 4.5*	2.99 g CH <sub>3</sub> COONa x 3H <sub>2</sub> O i 1.6 ml CH <sub>3</sub> COOH <sub>glac</sub>
acetatni pufer pH 5.5*	5.98 g CH <sub>3</sub> COONa x 3H <sub>2</sub> O i 0.4 ml CH <sub>3</sub> COOH <sub>glac</sub>
fosfatni pufer pH 6.0*	6.8 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> i 5.6 ml 1 mol/l NaOH
fosfatni pufer pH 6.8*	6.8 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> i 22.4 ml 1 mol/l NaOH
fosfatni pufer pH 7.4*	6.8 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> i 39.1 ml 1 mol/l NaOH
fosfatni pufer pH 8.0*	6.8 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> i 46.1 ml 1 mol/l NaOH
0.01 M HCl sa 0.2% NaLS**	100 ml 0.3 M HCl i 2 g NaLS
0.05 M fosfatni puffer pH 7.4***	6.81 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> i 1.56 g NaOH

\* u skladu sa propisima USP 34 [8]

\*\* u skladu sa propisom USP 34 za ispitivanje brzine rastvaranja za tablete sa trenutnim oslobađanjem levotiroksin-natrijuma [8]

\*\*\* u skladu sa propisom USP 24 za ispitivanje brzine rastvaranja za tablete sa trenutnim oslobađanjem levotiroksin-natrijuma [24]

## 4.1.2 Metode

### 4.1.2.1 Ispitivanje rastvorljivosti

Kao medijumi za ispitivanje rastvorljivosti levotiroksin-natrijuma korišćeni su prečišćena voda, USP hidrohloridni medijum pH 1.2 i 3, USP acetatni puferi pH 4.5 i 5.5 i USP fosfatni puferi 6.0, 6.8, 7.4 i 8.0 (tabela 9). Rastvorljivost levotiroksin-natrijuma je ispitana tako što je supstanca u višku (10 mg) dodata u 10 ml odgovarajućeg medijuma, nakon čega je dobijena suspenzija mešana na laboratorijskom šejkeru (*Haake SWB 20*, Nemačka), zaštićeno od svetlosti, pri brzini od 100 rpm na temperaturi od  $37 \pm 1$  °C, u toku 24 sata. Nakon dodatnih 24 sata stajanja bez mešanja,

uzorci su centrifugirani (15 min na 3000 rpm) i supernatanti filtrirani kroz membranske filtere od staklenih vlakana (*Macherey-Nagel*, Nemačka). Koncentracija rastvorenog levotiroksin-natrijuma određivana je metodom visoko efikasne tečne hromatografije (HPLC) na sistemu HP1100 (*Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD*) sa HP1100 binarnom pumpom, UV/VIS detekcijom i autosemplerom. Obrada podataka je izvršena u Agilent Chemstation softveru. Hromatografsko određivanje je vršeno na koloni Zorbax SB-C18, 250 mm x 4.6 mm, sa veličinom čestica od 5 µm. Kao mobilna faza korišćena je smeša 0.1% (m/v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> i acetonitrila u odnosu 65:35 (v/v). Brzina protoka mobilne faze je iznosila 1.5 ml/min, a kolona je bila termostatirana na 25 °C. Injekciona zapremina je bila 100 µl. Metoda je linearna u opsegu koncentracija levotiroksin-natrijuma 0.10-0.31 µg/ml (koeficijent korelacije veći od 0.995). RSD vrednosti za preciznost u toku jednog dana i između različitih dana su bile manje od 2%.

#### **4.1.2.2 Ispitivanje variranja mase tableta**

Ispitivanje variranja mase izvedeno je prema propisu EP 2.9.5 [163] (vaga *Mettler*, SAD). Pojedinačno je izmerena masa 20 tableta i izračunata prosečna masa kao aritmetička sredina.

#### **4.1.2.3 Ispitivanje raspadljivosti tableta**

Ispitivanje raspadljivosti tableta je izvedeno prema propisu EP 2.9.1 [163], u aparaturi za ispitivanje raspadljivosti (*Erweka ZT3*, Nemačka), u destilovanoj vodi na temperaturi od 37 °C. Prema zahtevu EP 2.9.1, tablete se moraju raspasti u vodi za 15 minuta.

#### **4.1.2.4 Ispitivanje čvrstine tableta**

Ispitivanje čvrstine tableta, koja predstavlja merenje sile loma tablete, je izvedeno prema propisu EP 2.9.8 [163], na aparatu *Erweka TBH 30* (Nemačka).

#### 4.1.2.5 Određivanje sadržaja levotiroksin-natrijuma u tabletama

Sadržaj levotiroksin-natrijuma u tabletama je određen HPLC metodom. Koncentracija levotiroksin-natrijuma u uzorku određena je metodom standarda. Standardni rastvor levotiroksin-natrijuma je pripremljen odmeravanjem oko 10 mg radnog standarda u odmerni sud od 20 ml. Po dodatku 10 ml metanola, rastvor je tretiran 10 min na ultrazvučnom kupatilu, a zatim je izvršeno dopunjavanje metanolom do oznake. 1 ml ovog rastvora je prenet u odmerni sud od 50 ml i dopunjen je metanolom do oznake. Koncentracija ovog rastvora je bila 10 µg/ml.

Za pripremu ispitivanog uzorka odmereno je i sprášeno 20 tableta. U odmerni sud od 25 ml prenet je ona količina praška koja odgovara 2.5 prosečne mase tablete. Dodato je oko 15 ml metanola i rastvor tretiran na ultrazvučnom kupatilu, a zatim dopunjen metanolom do oznake. Dobijeni rastvor je filtriran kroz membranski filter od staklenih vlakana. Koncentracija levotiroksina određivana je na sistemu HP1100 (*Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD*) sa HP1100 binarnom pumpom, UV/VIS detekcijom i autosemplerom. Obrada podataka je izvršena u *Agilent Chemstation* softveru. Hromatografsko određivanje je vršeno na koloni Zorbax SB-CN, 250 mm x 4.6 mm, sa veličinom čestica od 5 µm. Kao mobilna faza korišćena je smeša 0.1% (m/v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> i acetonitrila u odnosu 65:35 (v/v). Brzina protoka mobilne faze je iznosila 1.5 ml/min, a kolona je bila termostatorana na 25 °C. Injekciona zapremina je bila 20 µl. Metoda je linearna u opsegu koncentracija levotiroksin-natrijuma 4.99-14.96 µg/ml (koeficijent korelacije veći od 0.995). RSD vrednosti za preciznost u toku jednog dana i između različitih dana su bile manje od 2%.

#### 4.1.2.6 Ispitivanje brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz tableta

Ispitivanje brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz ispitivanih preparata sprovedeno je na 12 pojedinačnih tableta u aparaturi sa rotirajućom lopaticom i u aparaturi sa rotirajućom korpicom (*Erweka DT80, Nemačka*), na temperaturi od 37 ± 0.5 °C. S obzirom na osetljivost levotiroksina na svetlost, pri ispitivanju su korišćeni tamni sudovi. Zapremina medijuma koja je korišćena u ispitivanju je bila 500 ml. Brzina obrtanja je bila 50 rpm i 75 rpm u aparaturi sa lopaticom i 100 rpm u aparaturi sa korpicom. Uticaj pH vrednosti i sastava medijuma na brzinu rastvaranja levotiroksin-

natrijuma iz tableta je ispitivan u aparaturi sa lopaticom na razvojnoj formulaciji i referentnom preparatu. Ispitivanje uticaja vrste aparature i intenziteta mešanja na brzinu rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz tableta je rađeno na razvojnoj formulaciji i referentnom preparatu, uz primenu medijuma pH 6.8. Ispitivanje brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz svih ispitivanih preparata je sprovedeno u skladu sa trenutno važećim uslovima za ovaj test u USP 34, koji podrazumevaju korišćenje 500 ml 0.01 M HCl sa 0.02% NaLS u aparaturi sa lopaticom, pri brzini obrtanja od 50 rpm [8], kao i u skladu sa uslovima koji su bili važeći u USP 24 (500 ml fosfatnog pufera pH 7.4, u aparaturi sa lopaticom, pri brzini obrtanja od 100 rpm) [24]. Sa obzirom da je za izvođenje studije bioekvivalencije preporučena doza levotiroksina od 600 µg, dodatno je ispitana brzina rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz razvojne formulacije i referentnog preparata po USP 34 i USP 24 metodi na zbirnom uzorku od po 6 tableta u jednoj posudi uređaja za ispitivanje brzine rastvaranja. Pregled svih primenjenih uslova ispitivanja prikazan je u tabeli 10.

**Tabela 10.** Pregled eksperimentalnih uslova korišćenih za praćenje brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz tableta sa trenutnim oslobađanjem

Vrsta medijuma	Vrsta aparature	Brzina obrtanja (rpm)
hidrohloridni medijum pH 1.2	lopatice	75
acetatni pufer pH 4.5	lopatice	75
	lopatice	50
fosfatni pufer pH 6.8	lopatice	75
	korpice	100
0.01 M HCl sa 0.02% NaLS	lopatice	50
fosfatni pufer pH 7.4	lopatice	100

U odgovarajućim vremenskim intervalima (nakon 10, 15, 20, 30, 45 i 60 minuta) uzorkovano je 10 ml medijuma i uzorak filtriran kroz membranske filtere od staklenih vlakana (*Macherey-Nagel*, Nemačka). Koncentracija rastvorenog levotiroksin-natrijuma određivana je prethodno opisanom HPLC metodom (4.1.2.1).



#### 4.1.2.7 Poređenje profila brzine rastvaranja

Sličnost *in vitro* profila dobijenih pod različitim eksperimentalnim uslovima procenjena je model-nezavisnim pristupom uz primenu faktora sličnosti ( $f_2$ ), koji se izračunava iz jednačine [35, 109, 164]:

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2 \right]^{-0.5} \right\} \times 100$$

n - broj tačaka u kojima se vrši merenje količine rastvorenog levotiroksin-natrijuma

$R_i$  - procenat rastvorene supstance za referentni uzorak u određenom vremenskom periodu t

$T_i$  - procenat rastvorene supstance za ispitivani uzorak u određenom vremenskom periodu t.

Vrednosti faktora sličnosti izračunate su iz srednjih vrednosti merenja, pri čemu je uzeto u obzir da poslednje vreme uzorkovanja predstavlja najviše jednu vrednost posle oslobađanja više od 85% aktivne supstance. Dobijeni profili brzine rastvaranja su smatrani sličnim ako je  $50 < f_2 < 100$  [35, 109, 164].

## 4.2 IN VIVO ISPITIVANJE

### 4.2.1 Protokol ispitivanja

U istraživanju su korišćeni podaci iz *in vivo* studije biološke ekvivalentnosti sprovedene u cilju komparativnog ispitivanja biološke raspoloživosti levotiroksina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem ("*in house*" raspoloživi podaci iz registracione dokumentacije Galenike a.d). Ispitivanje biološke ekvivalentnosti sprovedeno je u Specijalnoj hirurškoj bolnici Zdravlje u Bačkom Petrovcu, prema protokolu odobrenom od strane Etičkog odbora bolnice i Etičkog odbora Zavoda za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, kao i u skladu sa Helsinškom deklaracijom o pravima čoveka, principima Dobre kliničke prakse, preporukama EMA/CPMP i FDA, kao i zakonskom regulativom o kliničkom ispitivanju lekova u Republici Srbiji [23, 35, 53-55, 165].

#### 4.2.1.1 Dizajn studije

Studija biološke ekvivalentnosti je izvedena kao komparativno, otvoreno, randomizovano, unakrsno ispitivanje u dve sekvence i dva perioda vremena, nakon jednokratne oralne primene ukupne doze od 600 µg (6 tableta levotiroksin-natrijuma od 100 µg) kod zdravih dobrovoljaca, u uslovima na gladno, sa *wash-out* periodom od 35 dana.

#### 4.2.1.2 Karakteristike ispitanika

U studiji bioekvivalencije su učestvovala 24 zdrava ispitanika, oba pola, starosti od 24 do 56 godina ( $33.3 \pm 9.7$ ; srednja vrednost  $\pm$  SD). Prosečna telesna masa ispitanika je bila  $73.3 \pm 13.3$ , a prosečna visina  $1.73 \pm 0.10$  (srednja vrednost  $\pm$  SD).

Pre odabira i uključivanja u ispitivanje, svi potencijalni kandidati su informisani usmeno i pismeno u pogledu ciljeva, procedura, rizika i ograničenja na jeziku koji je njima razumljiv. Učešće u ispitivanju je bilo isključivo dobrovoljno. Učešće u ispitivanju ispitanici su potvrdili potpisivanjem Informisanog pristanka.

Svaki ispitanik je morao proći detaljan lekarski pregled i laboratorijske testove (sakupljanje demografskih podataka, porodična anamneza, fizikalni pregled, hematološke i biohemijske analize, HbsAg, HCV i AntiHIV testove, test na trudnoću). U ispitivanje nisu bili uključeni ispitanici sa znacima akutne bolesti, kao i dobrovoljci sa hroničnim oboljenjima kao što su oboljenja kardiovaskularnog sistema, poremećaji tireoidne funkcije, insuficijencija kore nadbubrega, *diabetes mellitus*, *diabetes insipidus*, oboljenja jetre, bubrega, gastrointestinalnog trakta, neurološka i psihijatrijska oboljenja.

U oba perioda ispitivanja ispitanici su hospitalizovani veče pre početka ispitivanja, proveli su u bolničkim uslovima sledeća 24 sata i drugog dana ujutru pušteni kući. Uzorkovanje krvi je rađeno prema protokolu studije u ambulantnim uslovima. Sedam dana pre početka ispitivanja bilo je zabranjeno uzimanje drugih lekova. Konkomitantna terapija u toku studije nije bila dozvoljena, osim one koja se primenjivala u svrhe ublažavanja neželjenih efekata. Svaki primenjeni konkomitantni lek je bio naveden u test listi. Dijeta i unos tečnosti su bili standardizovani. Uzimanje hrane i pića nije bilo dozvoljeno 10 sati pre i 4 sata nakon primene ispitivanog leka. Ako se uzorkovanje podudarilo sa obrokom, prednost je data uzorkovanju. Osim vode

koja je davana sa lekom koji se ispitivao, unos ostalih tečnosti nije bio dozvoljen 2 sata pre i 2 sata nakon doziranja. Od svih ispitanika je traženo da se uzdržavaju od alkohola i da izbegavaju unos bilo kakvih pića ili hrane koji sadrže ksantine (kafa, čaj, kakao, čokolada, koka-kola) 24 sata pre primene leka koji se ispituje, pa sve do kraja studije, kao i da ne konzumiraju grejpfrut (sveži, smrznuti) u periodu od 7 dana pre početka ispitivanja do kraja studije.

Isključivanje ispitanika iz studije bioekvivalencije je bilo moguće samo po dogovoru glavnog istraživača sa licem odgovornim za kliničko ispitivanje leka, u slučajevima povrede protokola studije, pojave teškog neželjenog događaja ili odlukom ispitanika, glavnog istraživača ili odgovornog lica.

#### **4.2.1.3 Randomizacija**

Ispitanici koji su uključeni u ovo ispitivanje metodom slučajnog izbora su raspoređeni u jednu od dve ispitivane grupe koje su imale podjednak broj ispitanika (dve grupe od po 12 ispitanika). Za randomizaciju je korišćen *GraphPad* softver.

#### **4.2.1.4 Ispitivani preparati**

Test formulacija i referentni preparat su primenjeni oralno u dozi od 600 µg (6 tableta), jednokratno, u uslovima na gladno, sa 200 ml negazirane mineralne vode, prema šemi randomizacije. Ispitanici su ispitivane preparate uzimali u sedećem položaju, u kom su ostajali najmanje 30 minuta nakon primene leka. Interval između dva perioda ispitivanja (*wash out* period) iznosio je 35 dana. Ispitanici koji su u prvom periodu ispitivanja primili test formulaciju, u drugom periodu su primili referentni preparat, i obrnuto.

#### **4.2.1.5 Uzimanje uzoraka za analizu**

Za procenu biološke ekvivalentnosti uzimano je po 4 ml krvi kroz intravensku kanilu, plasiranu u kubitalnu venu ispitanika neposredno pre primene ispitivanja. Uzorci su uzimani u unapred određeno vreme: pre unošenja ispitivanih lekova -0,30 (uzorak 1); -0,15 (uzorak 2); 0 (uzorak 3) i 0,33 (uzorak 4); 0,66 (uzorak 5); 1 (uzorak 6); 1,33 (uzorak 7); 1,66 (uzorak 8); 2 (uzorak 9); 2,5 (uzorak 10); 3 (uzorak 11); 4 (uzorak 12);

6 (uzorak 13); 9 (uzorak 14); 12 (uzorak 15); 24 (uzorak 16) i 48 (uzorak 17) sati posle njihove primene. Predviđena zapremina krvi po uzorkovanju, shodno individualnim vrednostima hematokrita, omogućila je dobijanje 2 ml plazme neophodne za formiranje 2 serije eksperimentalnih uzoraka. Odmah posle uzimanja, krv je centrifugirana i dobijeni uzorci plazme su zamrznuti i čuvani na -20 °C do izvođenja analize.

#### **4.2.1.6 Kvantitativna analiza levotiroksina u uzorcima krvi**

Određivanje koncentracije levotiroksina i trijodotironina u uzorcima plazme vršeno je kompetitivnom hemiluminescentnom metodom na automatskom imunološkom analizatoru Immulite 2000 (*Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA, SAD*). Limit detekcije metode za levotiroksin bio je 3.0 ng/ml, a za trijodotironin 0.2 ng/ml. Linearnost je uspostavljena za opseg 10 do 240 ng/ml za levotiroksin i za opseg 0.4 do 6.0 ng/ml za trijodotironin. Tačnost metode za levotiroksin u toku jednog dana za dva uzorka koncentracija 82.4 ng/ml i 124.0 ng/ml bila je 4.2 i 8.0%, redom, dok je tačnost u toku više dana za pomenute koncentracije bila 5.0 i 5.5%. Tačnost metode za trijodotironin u toku jednog dana za dva uzorka koncentracija 1.6 ng/ml i 3.4 ng/ml bila je 4.9 i 5.3%, redom, dok je tačnost u toku više dana za pomenute koncentracije bila 5.6 i 6.9%.

#### **4.2.1.7 Farmakokinetička i statistička analiza**

Profili koncentracija levotiroksina u plazmi u funkciji vremena za svakog ispitanika okarakterisani su na osnovu vrednosti odgovarajućih farmakokinetičkih parametara:  $C_{max}$ ,  $t_{max}$ ,  $PIK_{0-t}$ ,  $PIK_{0-\infty}$ ,  $k_{el}$  (konstanta brzine eliminacije) i  $t_{1/2}$  (poluvreme eliminacije). Određivanje farmakokinetičkih parametara je izvršeno sa korekcijom i bez korekcije koncentracije levotiroksina u odnosu na endogeni (*baseline*) nivo. Korekcija je vršena oduzimanjem srednje vrednosti koncentracija tri uzorka pre davanja leka od svake očitane koncentracije levotiroksina. Za farmakokinetičku i statističku analizu korišćen je *Equiv Test*<sup>®</sup> softver (verzija 2.0, *Statcon*, Nemačka). Svi parametri određeni su model-nezavisnom analizom, prema zahtevima za sprovođenje studija bioekvivalencije [35].  $C_{max}$  i  $t_{max}$  su određeni sa grafika zavisnosti koncentracije leka u funkciji vremena, a  $PIK_{0-t}$  i  $PIK_{0-\infty}$  su izračunati metodom trapezoida.  $PIK_{0-\infty}$  je

izračunata iz jednačine  $PIK_{0-\infty} = PIK_{0-t} + C_n/k_{el}$ , gde je  $C_n$  koncentracija u poslednjem uzorku plazme i  $k_{el}$  konstantna brzine eliminacije koja je izračunata iz jednačine  $k_{el} = \ln 2/t_{1/2}$ . Svi farmakokinetički parametri su logaritamski transformisani i upoređeni analizom varijanse (ANOVA), pri čemu su uticaj sekvence, formulacije i perioda razmatrani kao fiksni efekti i uticaj ispitanika u okviru sekvence kao randomizovani efekat. Korišćen je nivo značajnosti od 0.05. Razvojna formulacija je smatrana bioekvivalentnom sa referentnim preparatom ako se 90% interval poverenja (CI) za razliku sume najmanjih kvadrata za logaritamski transformisane parametre  $C_{max}$ ,  $PIK_{0-t}$  i  $PIK_{0-\infty}$  nalazio u opsegu 80-125%. Deskriptivna statistička analiza (srednja vrednost, SD, minimalna vrednost, maksimalna vrednost i koeficijent varijacije) je urađena za sve navedene farmakokinetičke parametre.

### 4.3 *IN SILICO* ISPITIVANJE

Za *in silico* simulaciju procesa resorpcije levotiroksina nakon oralne primene korišćen je *GastroPlus<sup>TM</sup>* programski paket (verzija 6.1.0003, *Simulations Plus, Inc., Lancaster, CA, SAD*).

*In vivo* resorpcija i dispozicija levotiroksina je simulirana na osnovu njegovih fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih parametara, kao i profila brzine rastvaranja uočenog *in vitro*. Kao ulazni parametri korišćene su eksperimentalno određene i *in silico* predviđene vrednosti i/ili literaturni podaci. Neophodni farmakokinetički parametri izračunati su na osnovu srednjeg profila koncentracije levotiroksina u funkciji vremena dobijenog za referentni preparat u studiji bioekvivalencije. U simulacijama je korišćen fiziološki sistem humanog gastrointestinalnog trakta u uslovima na gladno (*Human Physiological Fasted model*), osim kada je simuliran uticaj hrane na resorpciju levotiroksina, gde je izabran fiziološki sistem humanog gastrointestinalnog trakta nakon primene obroka (*Human Physiological Fed model*). Za procenu promena u permeabilnosti u toku dispozicije levotiroksina kroz različite delove gastrointestinalnog trakta izabran je Opt logD Model SA/V 6.1. Koeficijenti C1 i C2 (koeficijenti resorpcionog gradijenta) su podešeni (pomoću modela za optimizaciju) tako da se simulacijom dobije profil koji najmanje odstupa od *in vivo* podataka. Na osnovu ovako podešenih koeficijenata izračunati su ASF faktori, koji definišu brzine resorpcije

lekovite supstance u određenom regionu gastrointestinalnog trakta. “*IR tablet mode*” je korišćen za sve simulacije. Kod predviđanja *in vivo* profila koncentracije levotiroksina u funkciji vremena na osnovu podataka o brzini rastvaranja levotiroksina iz tableta korišćena je “*CR-dispersed*” opcija. “CR” opcija simulira oslobađanje rastvorenog leka, a disperzni oblik znači da se ispitivana tableta nakon primene raspada i dalje transportuje u obliku disperzije [140]. Za predviđanje resorpcije su korišćeni modul pojedinačne simulacije (*Single Simulation Mode*), koji predviđa profil koncentracije leka u funkciji vremena na osnovu konkretnih vrednosti ulaznih parametara, kao i modul virtuelne studije (*Virtual Trial Mode*), koji omogućava izvođenje serije simulacija u kojima se vrednosti izabranih fizioloških, farmakokinetičkih i fizičko-hemijskih parametara randomizovano menjaju u skladu sa unapred definisanim profilom distribucije [140].

## 5 REZULTATI I DISKUSIJA

### 5.1 *IN VITRO* ISPITIVANJE

#### 5.1.1 Rastvorljivost levotiroksin-natrijuma

Rastvorljivost levotiroksin-natrijuma u ispitivanim medijumima, kao i izračunati odnosi između različitih doza i eksperimentalno određenih vrednosti za rastvorljivost, prikazani su u tabeli 11.

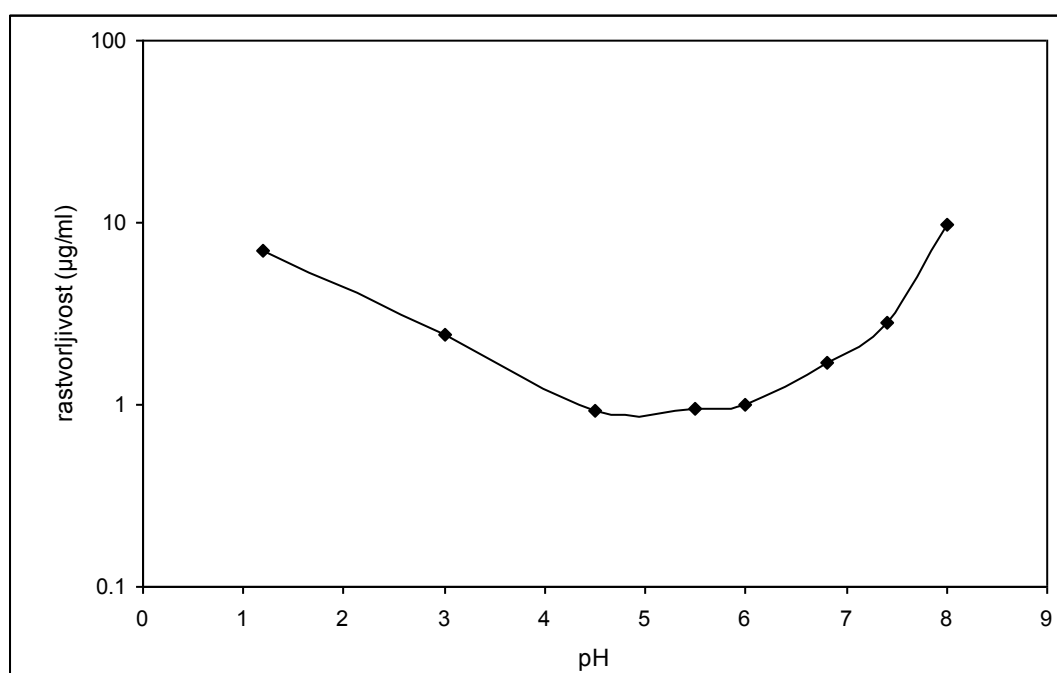
Rezultati ispitivanja rastvorljivosti pokazuju da se rastvorljivost levotiroksin-natrijuma smanjuje sa povećanjem pH vrednosti medijuma, dostiže minimalnu vrednosti pri pH 4-5 i zatim opet raste sa daljim povećanjem pH vrednosti (slika 7). Dobijeni profil rastvorljivosti potvrđuje da je levotiroksin amfoterno jedinjenje koje pri različitim pH vrednostima različito jonizuje. Ovakvi rezultati su u skladu sa rezultatima Wona koji je takođe odredio pH-zavisni profil rastvorljivosti levotiroksin-natrijuma, ali na 25 °C [20]. On je pronašao da je najniža rastvorljivost 0.25 µg/ml i da je to rastvorljivost cviterjona u pH oblasti 4-5, dok je najveća rastvorljivost 120 µg/ml, što odgovara anjonskoj strukturi molekula. Rezultati ispitivanja rastvorljivosti prikazani u tabeli 11 su nešto viši u odnosu na vrednosti prikazane u radu Wona, što se može očekivati, jer je rastvorljivost određivana na višoj temperaturi. Odnosi doza/rastvorljivost, za tri različite doze levotiroksin-natrijuma, izračunati korišćenjem eksperimentalno određenih rastvorljivosti za date pH vrednosti, pokazuju da zahtev da odnos doza/rastvorljivost bude manji od 250 ml da bi supstanca bila klasifikovana kao visoko rastvorljiva nije ispunjen samo za dozu od 600 µg pri pH intervalu od 4.5 do 6.8 [35, 80]. Međutim, primena tako visoke doze levotiroksin-natrijuma, koja se koristi u studijama bioekvivalencije u skladu sa preporukama važeće smernice, nije uobičajena u kliničkoj praksi [12]. Puna supstituciona doza kod odraslih osoba iznosi 100-150 µg dnevno i doze veće od 200 µg dnevno su retko potrebne [12, 166]. Na osnovu toga se može zaključiti da levotiroksin-natrijum, u opsegu doza koje se uobičajeno koriste u terapiji, ispunjava uslov da bude okarakterisan kao visoko rastvorljiva supstanca u skladu sa kriterijumima BCS sistema.

**Tabela 11.** Rastvorljivost levotiroksin-natrijuma, odnos doza/rastvorljivost i dozni broj na 37 °C u različitim medijumima

pH	Rastvorljivost ( $\mu\text{g/ml}$ )	Doza ( $\mu\text{g}$ )					
		100		150		600	
		doza/rastvorljivost	dozni broj	doza/rastvorljivost	dozni broj	doza/rastvorljivost	dozni broj
voda (pH 5.6)	20.0	5.0	0.02	7.5	0.03	30.0	0.12
pH 1.2	7.10	14.1	0.06	21.1	0.08	84.5	0.34
pH 3.0	2.45	40.8	0.16	61.2	0.24	244.9	0.98
pH 4.5	0.92	108.7	0.43	163.0	0.65	652.2	2.61
pH 5.5	0.94	106.4	0.42	159.6	0.64	638.3	2.55
pH 6.0	1.01	99.0	0.40	148.5	0.59	594.0	2.38
pH 6.8	1.70	52.6	0.21	78.9	0.32	315.8	1.26
pH 7.4	2.80	35.7	0.14	53.6	0.21	214.3	0.86
pH 8.0	9.70	10.3	0.04	15.5	0.06	61.8	0.25



Kako su literaturni podaci i eksperimentalno dobijene vrednosti za rastvorljivost levotiroksin-natrijuma u različitim puferima znatno niži od literaturnih podataka za rastvorljivost u vodi, određena je rastvorljivost i u ovom medijumu. Dobijena eksperimentalna vrednost je bila veća u odnosu na vrednosti u puferima, ali nešto manja od vrednosti koje se mogu naći u literaturi [14, 19]. Takođe, u literaturi se mogu pronaći podaci da levotiroksin-natrijum pripada BCS grupi I, BCS grupi II i BCS grupi III [15, 21, 22]. Ovakva nelogičnost i kontradiktornost se može objasniti činjenicom da levotiroksin pokazuje specifično ponašanje u pogledu procesa rastvaranja. Naime, iako se u literaturi najčešće može naći vrednost od 0.15 mg/ml za rastvorljivost u vodi, njegova osnovna brzina rastvaranja je manja od  $0.2 \mu\text{g}/\text{min}/\text{cm}^2$  [9]. Ova neusaglašenost se objašnjava time da se molekuli levotiroksina u vodi međusobno udružuju formirajući velike rastvorne agregate, prečnika od 20-100 nm [9]. Udruživanje molekula levotiroksina se može objasniti na osnovu njegove hemijske strukture. Udruživanje se verovatno odvija mehanizmima koji uključuju stvaranje kovalentnih i nekovalentnih veza i formiranje vodoničnih veza između vode i polarnih grupa koje se nalaze na površinih agregata (karboksilna i amino grupa alaninskog bočnog niza i fenolna hidroksilna grupa), a što je i od najvećeg značaja za postizanje dobre rastvorljivosti. Stvaranje ovih agregata omogućava postizanje rastvorljivosti veće od 1.5 mg/ml [9], zbog čega je pravu rastvorljivost levotiroksin monomera u vodi teško odrediti.



Slika 7. pH-zavisan profil rastvorljivosti levotiroksin-natrijuma

### 5.1.2 Karakteristike ispitivanih preparata

Farmaceutsko-tehnološke karakteristike ispitivanih preparata u pogledu sadržaja aktivne supstance, variranja mase, raspadljivosti i čvrstine prikazane su u tabeli 12.

**Tabela 12.** Farmaceutsko-tehnološke karakteristike ispitivanih preparata

Preparat	Sadržaj levotiroksin-natrijuma (µg/tableti)	Masa ± sd (mg)	Raspadljivost (s)	Čvrstina (kP)
T1	98.8	191.45 ± 1.01	390	12.5
T2	99.7	190.70 ± 0.36	220	10.4
R	99.9	101.37 ± 0.56	313	7.1
G	101.0	108.87 ± 0.98	193	5.0

Ispitani uzorci su u pogledu farmaceutsko-tehnoloških karakteristika zadovoljavavali zahteve EP. Najveću čvrstinu i najduže vreme dezintegracije je pokazala prvobitna formulacija, dok je najmanja čvrstina i najkraće vreme raspadljivosti uočeno kod uporednog generičkog preparata, koji je, za razliku od ostalih ispitivanih preparata, izrađen metodom direktne kompresije.

### 5.1.3 Brzina rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz tableta

Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz tableta pod eksperimentalnim uslovima propisanim u važećoj Američkoj farmakopeji USP 34 (0.01 M HCl sa 0.2% NaLS pri brzini obrtanja lopatica od 50 rpm) i USP 24 (fosfatni pufer pH 7.4 pri brzini obrtanja lopatica od 100 rpm) za prvobitnu formulaciju, razvojnu formulaciju, referentni i uporedni preparat prikazani su u tabelama 13-16 i na slici 8.

**Tabela 13.** Procenat oslobođenog levotiroksin-natrijuma iz preparata T1

Tableta	Vreme (min)											
	fosfatni pufer pH 7.4						0.01 M HCl sa 0.2% NaLS					
	10	15	20	30	45	60	10	15	20	30	45	60
1	62.13	79.99	82.01	85.67	89.05	90.00	34.00	44.04	50.12	51.8	53.67	69.03
2	65.78	78.72	84.00	87.13	93.79	94.03	29.98	38.69	45.27	45.60	52.75	58.78
3	56.71	73.96	81.19	84.98	89.99	89.88	32.05	40.88	49.12	50.59	55.89	61.12
4	55.92	72.44	79.98	84.65	89.37	88.38	28.89	34.88	40.88	41.88	45.39	50.05
5	64.00	81.25	82.34	87.00	91.07	91.11	33.54	37.50	43.99	44.12	49.89	54.12
6	54.12	70.16	76.83	80.12	85.73	86.73	30.75	44.45	49.79	50.39	55.03	57.79
7	63.31	77.75	80.01	83.85	87.06	86.79	38.59	42.90	46.39	46.98	53.98	62.29
8	57.89	73.91	78.93	84.94	87.19	88.21	36.73	42.88	45.01	46.00	50.71	56.77
9	62.02	79.98	83.52	87.88	90.17	90.93	30.17	34.02	39.55	40.12	45.89	50.39
10	66.02	80.03	85.32	88.03	91.04	91.00	31.26	38.59	40.71	41.19	46.29	61.23
11	66.82	79.19	81.32	84.11	85.23	85.33	36.59	42.88	49.29	50.03	55.97	60.78
12	53.08	70.14	77.27	82.00	85.67	85.01	33.93	47.17	55.00	55.90	56.14	63.25
x <sub>sr</sub>	60.65	76.46	81.06	85.03	88.78	88.95	33.04	40.74	46.26	47.05	51.80	58.80
SD	4.87	4.08	2.60	2.36	2.63	2.69	3.06	4.03	4.61	4.81	4.09	5.44

**Tabela 14.** Procenat oslobođenog levotiroksin-natrijuma iz preparata T2

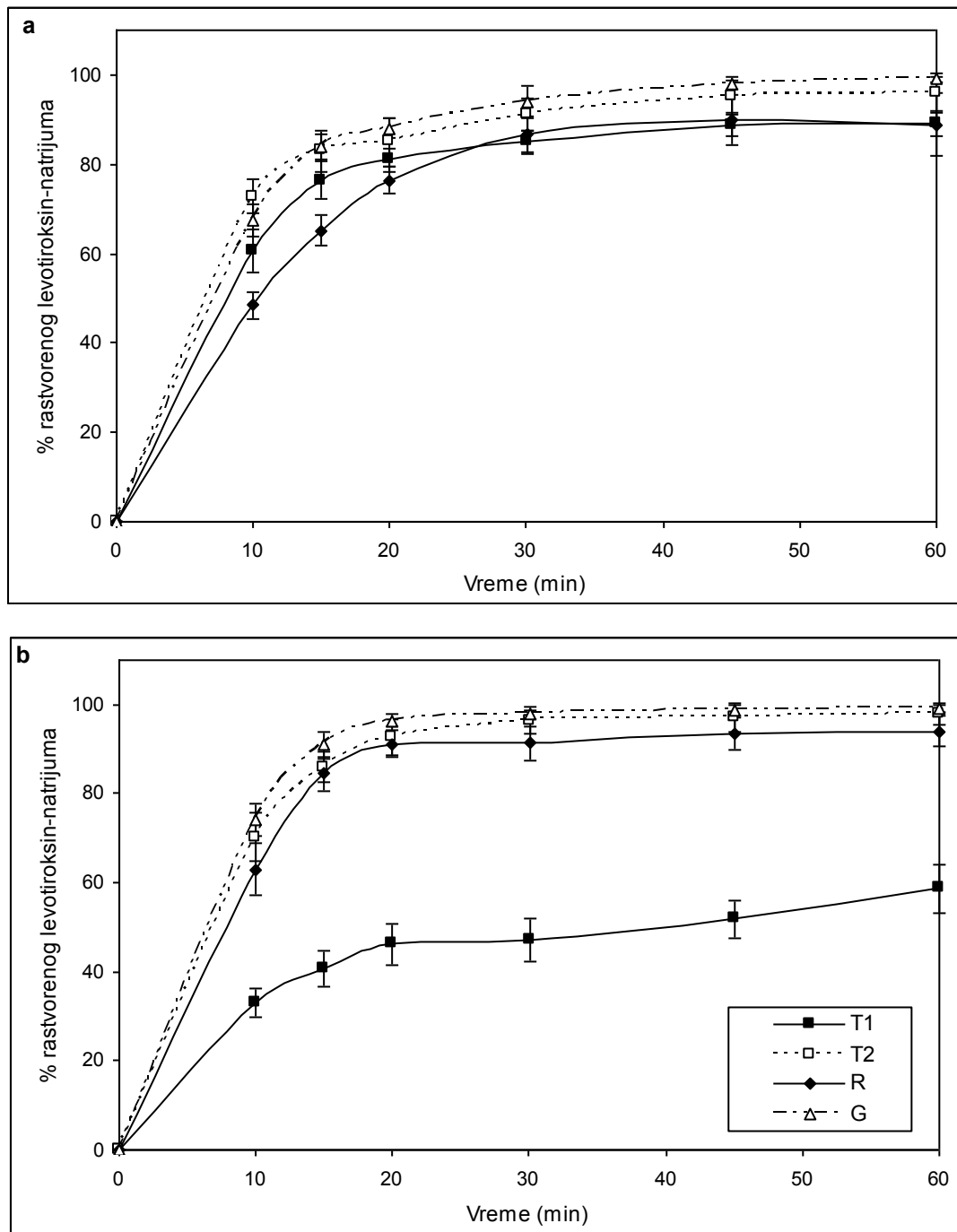
Tableta	Vreme (min)											
	fosfatni pufer pH 7.4						0.01 M HCl sa 0.2% NaLS					
	10	15	20	30	45	60	10	15	20	30	45	60
1	73.45	80.19	86.45	90.12	95.40	94.56	65.48	86.56	86.45	95.00	95.40	100.20
2	69.99	86.66	88.48	88.78	92.35	100.78	62.56	87.89	88.48	96.45	99.45	95.56
3	81.20	89.72	81.46	94.56	93.45	101.65	73.45	84.56	96.56	94.56	101.00	96.30
4	76.56	78.04	82.47	93.14	89.74	92.36	72.18	80.45	95.47	93.14	98.00	99.78
5	68.18	80.29	86.78	89.45	91.07	89.55	74.56	84.20	95.20	98.89	100.45	96.99
6	70.12	88.85	87.47	95.67	94.56	94.12	73.01	83.69	94.10	99.00	94.56	98.21
7	69.78	75.14	88.47	93.12	93.26	98.33	71.98	88.47	95.41	95.46	98.47	99.47
8	67.98	79.67	82.14	85.02	98.70	97.16	72.48	87.40	95.12	95.41	98.70	102.00
9	73.45	84.42	79.98	94.56	91.45	95.40	73.46	89.98	97.47	96.78	96.14	95.40
10	72.98	88.02	78.41	93.20	100.05	100.67	61.45	90.23	93.45	98.60	99.32	94.12
11	74.19	79.64	80.10	89.44	98.36	94.16	63.40	87.89	85.60	99.45	94.00	100.30
12	75.84	84.88	97.67	85.18	101.37	91.22	77.79	79.60	88.61	91.18	90.31	96.23
x <sub>sr</sub>	72.81	82.96	84.99	91.02	94.98	95.83	70.15	85.91	92.66	96.16	97.15	97.88
SD	3.88	4.74	5.36	3.58	3.81	3.93	5.41	3.46	4.17	2.55	3.13	2.45

**Tabela 15.** Procenat oslobođenog levotiroksin-natrijuma iz preparata R

Tableta	Vreme (min)											
	fosfatni pufer pH 7.4						0.01 M HCl sa 0.2% NaLS					
	10	15	20	30	45	60	10	15	20	30	45	60
1	47.90	65.49	73.45	85.56	93.70	99.17	61.00	86.47	93.12	93.56	94.54	96.45
2	49.58	66.95	76.45	84.15	87.56	89.10	62.70	81.56	87.56	89.56	96.48	96.12
3	51.00	68.89	77.98	89.99	87.96	90.20	72.41	83.14	96.56	87.56	90.12	93.89
4	48.12	65.45	78.49	92.45	95.78	91.45	71.00	80.41	90.24	93.41	96.78	99.05
5	46.90	66.45	73.12	85.56	91.56	87.45	58.47	88.00	90.10	93.11	92.50	92.36
6	47.89	61.23	80.48	80.19	87.56	87.60	59.00	86.47	87.49	95.46	90.41	91.47
7	49.56	62.30	74.45	88.47	88.46	91.20	67.12	90.10	89.02	84.56	89.90	93.69
8	53.12	59.89	72.41	91.78	89.89	90.30	58.30	79.98	95.12	90.20	90.14	89.90
9	50.18	67.23	79.11	85.22	93.47	95.40	52.40	78.41	89.12	93.50	96.14	91.26
10	49.18	61.45	73.14	87.03	91.12	86.90	61.45	83.26	92.40	88.70	89.00	94.12
11	47.99	70.45	80.04	90.42	95.99	88.00	63.40	87.89	89.60	98.14	99.00	100.30
12	40.10	66.38	77.68	79.46	74.55	69.91	68.03	88.79	93.47	87.60	96.75	89.63
x <sub>sr</sub>	48.46	65.18	76.40	86.69	89.80	88.89	62.94	84.54	91.15	91.28	93.48	94.02
SD	3.12	3.27	2.95	4.19	5.68	6.96	5.82	3.90	2.94	3.88	3.50	3.42

**Tabela 16.** Procenat oslobođenog levotiroksin-natrijuma iz preparata G

Tableta	Vreme (min)											
	fosfatni pufer pH 7.4						0.01 M HCl sa 0.2% NaLS					
	10	15	20	30	45	60	10	15	20	30	45	60
1	64.64	84.89	85.57	96.54	98.63	98.03	73.19	88.79	95.45	97.76	97.99	97.65
2	73.07	86.02	88.88	98.00	99.17	99.99	74.34	86.95	96.96	98.23	99.68	100.03
3	66.93	81.49	90.86	98.86	99.99	100.02	75.39	92.81	97.71	99.06	99.93	99.04
4	61.23	80.22	90.63	92.37	97.61	98.99	74.99	91.30	98.00	99.49	99.91	99.89
5	70.37	79.49	85.11	93.59	98.77	99.06	75.03	94.57	97.60	98.19	98.63	98.74
6	71.04	86.02	86.16	90.12	98.28	98.93	72.94	89.82	97.92	99.29	100.07	99.91
7	65.83	85.86	85.89	96.72	99.82	100.92	79.83	93.61	95.72	96.78	97.57	98.02
8	66.11	83.66	91.83	97.65	98.89	99.82	76.88	95.00	97.22	99.48	99.28	100.02
9	73.12	82.03	89.07	89.97	98.02	99.97	70.06	88.59	95.53	98.44	98.72	99.86
10	67.23	88.77	89.91	92.60	97.30	99.92	66.22	85.74	93.79	94.79	97.59	98.47
11	65.72	84.27	85.77	89.69	95.14	98.05	73.93	91.68	95.79	96.27	96.74	98.98
12	65.31	85.64	87.76	90.57	95.82	98.62	76.64	92.42	96.19	97.50	99.25	99.31
x <sub>sr</sub>	67.55	84.03	88.12	93.89	98.12	99.36	74.12	90.94	96.49	97.94	98.78	99.16
SD	3.62	2.74	2.38	3.48	1.47	0.88	3.45	2.98	1.29	1.43	1.10	0.82



**Slika 8.** Profili brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz uzoraka tableta T1, T2, R i G: u fosfatnom puferu pH 7.4 pri brzini obrtanja lopatica od 100 rpm (USP 24 metoda) (a) i u 0.01 M HCl sa 0.2% NaLS pri brzini obrtanja lopatica od 50 rpm (USP 34 metoda) (b). Prikazane su srednje vrednosti  $\pm$  SD (n=12)

Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz prvobitne formulacije su odgovarali zahtevima USP 24, ali nisu bili u skladu sa zahtevima testa koji propisuje upotrebu 0.01 M HCl sa 0.2% NaLS, a koji se prvi put pojavio u USP 25 i trenutno je važeći u USP 34 (slika 8). Oslobođanje levotiroksin-natrijuma iz ove formulacije u fosfatnom puferu je bilo brzo, sa više od 85% leka oslobođenog za 30 minuta, dok je u 0.01 M HCl sa 0.2% NaLS uočeno znatno sporije i nepotpuno oslobođanje lekovite supstance. Potreba za optimizacijom formulacije je i nastala upravo kao posledica značajnih izmena u zahtevima USP za brzinu rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz tableta sa trenutnim oslobođanjem. Cilj optimizacije je bio dobijanje čvrstog lekovitog oblika koji će obezbediti oslobođanje lekovite supstance brzinom sličnom onoj koja se postiže iz referentnog preparata, što je jedan od preduslova za dobru biološku raspoloživost lekovite supstance. Rad na optimizaciji formulacije obuhvatao je opsežna ispitivanja na osnovu kojih je odabrana optimalna formulacija (tabela 7).

Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz razvojne formulacije, referentnog i uporednog generičkog preparata su bili u skladu i sa zahtevima USP 24 i sa zahtevima USP 34 [8, 24]. Oslobođanje levotiroksin-natrijuma iz ispitivanih preparata bilo je znatno veće u 0.01 M HCl sa dodatkom surfaktanta. U fosfatnom puferu pH 7.4 ukupna količina oslobođene supstance je bila niža, sa više od 85% levotiroksin-natrijuma oslobođenog nakon 20 minuta u slučaju razvojne formulacije i uporednog preparata, dok je najsporije oslobođanje aktivne supstance pokazao referentni preparat, sa više od 85% levotiroksina oslobođenog nakon 30 minuta. Prisustvo surfaktanta u medijumu je značajno uticalo na povećanje količine oslobođenog levotiroksin-natrijuma, što je posebno bilo izraženo u slučaju referentnog preparata. Ovakvi rezultati su u skladu sa rezultatima Volpata i saradnika [27]. Izračunata  $f_2$  vrednost (67.6) pokazuje da se profili razvojne formulacije i referentnog preparata u medijumu sa surfaktantom mogu smatrati sličnim (tabela 17). Uporedni preparat takođe pokazuje slično ponašanje u ovom medijumu i sa razvojnom formulacijom i sa referentnim preparatom (tabela 17). Izvesne razlike između razvojne formulacije i referentnog preparata, kao i između uporednog i referentnog preparata, uočene su kada je ispitivanje brzine rastvaranja izvedeno u skladu sa uslovima propisanim u USP 24.



**Tabela 17.** Izračunate vrednosti faktora sličnosti za ispitivane preparate u različitim medijumima

Medijum	f <sub>2</sub>	
	pH 7.4	0.01 M HCl + 0.2% NaLS
T2 vs. T1	55.3	37.6
T2 vs. R	40.1	67.6
T2 vs. G	71.4	veoma brzo rastvaranje
R vs. T1	67.5	19.5
R vs. G	41.0	54.5
G vs. T1	55.7	16.5

#### **5.1.3.1 Uticaj pH vrednosti medijuma na brzinu rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz tableta**

Uticaj pH vrednosti medijuma na brzinu rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz tableta je ispitan na primeru razvojne formulacije i referentnog preparata primenom medijuma različitih pH vrednosti u aparaturi sa rotirajućom lopaticom pri brzini od 75 rpm. Rezultati ispitivanja prikazani su u tabelama 18-20 i na slici 9.

**Tabela 18.** Procenat oslobođenog levotiroksin-natrijuma u hidrohloridnom medijumu pH 1.2, pri brzini obrtanja lopatice od 75 rpm

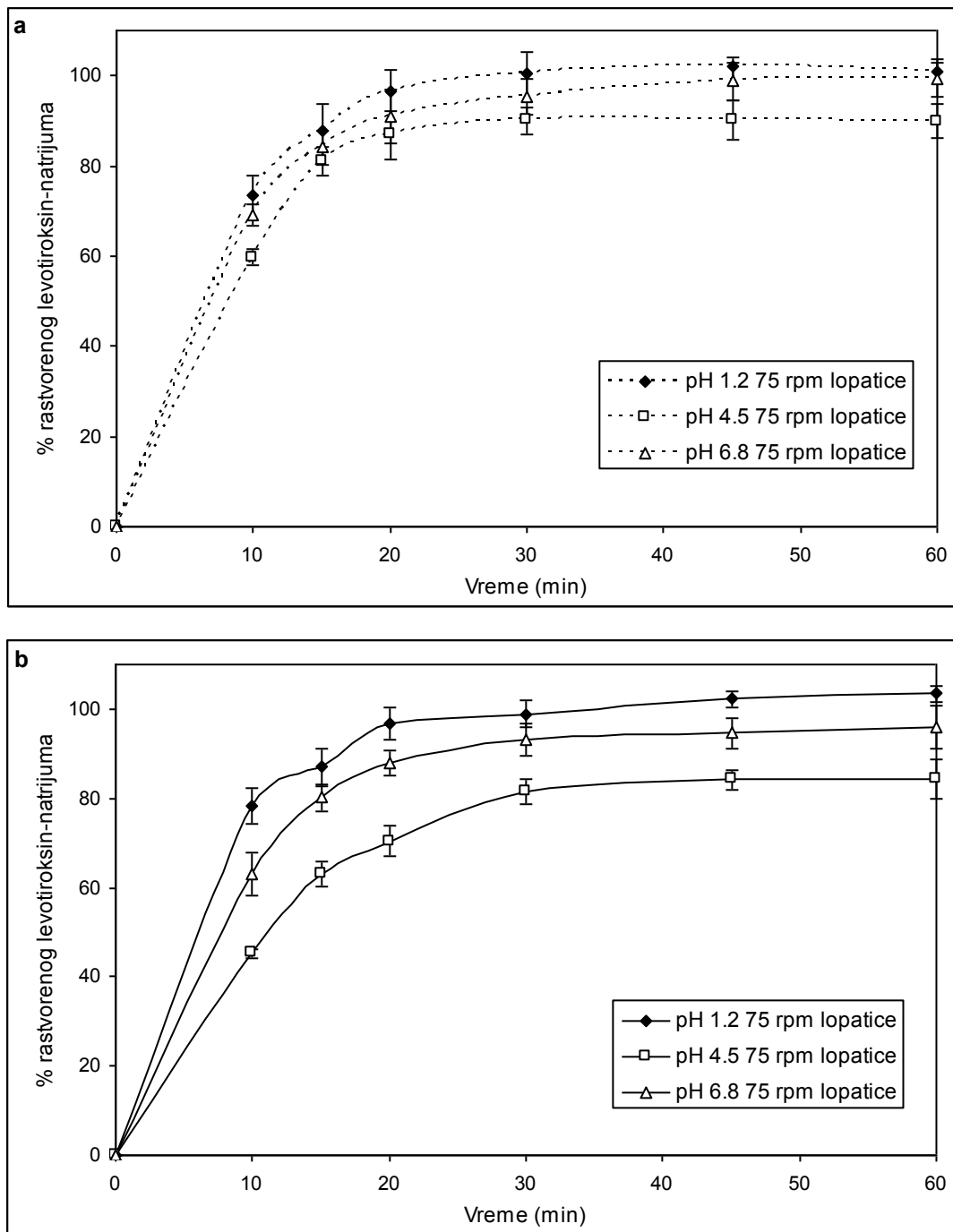
Tableta	Vreme (min)											
	T2						R					
	10	15	20	30	45	60	10	15	20	30	45	60
1	74.59	89.90	88.00	99.00	103.47	100.20	81.23	81.50	96.56	97.20	100.20	106.00
2	76.47	86.47	94.56	102.30	103.36	100.30	77.45	86.98	100.12	96.54	100.50	101.00
3	78.14	90.47	98.47	96.40	101.56	102.20	76.14	93.40	98.56	101.00	101.50	102.30
4	72.11	91.60	99.00	103.20	104.00	101.99	70.69	82.50	99.23	95.40	101.00	106.40
5	70.56	88.47	99.48	99.59	100.56	103.50	80.56	81.40	94.20	98.90	100.40	101.20
6	72.69	92.00	97.14	101.23	102.30	103.45	81.36	90.01	92.56	100.30	99.99	99.45
7	70.44	86.14	96.99	100.56	98.63	99.40	74.10	92.40	93.47	97.56	100.56	105.20
8	75.89	92.31	98.63	99.48	100.56	96.56	72.90	80.36	98.60	97.80	102.30	102.39
9	73.12	84.00	100.20	102.56	100.78	103.41	86.40	83.00	95.40	102.60	97.50	103.56
10	68.78	82.47	99.42	98.60	101.30	101.30	81.47	92.40	98.60	99.56	103.50	106.26
11	69.45	87.89	98.00	99.45	103.40	98.70	85.65	89.97	95.00	97.10	101.20	106.47
12	79.64	82.96	89.43	103.15	103.48	100.39	71.89	89.48	99.54	103.2	119.55	100.81
$\bar{x}_{sr}$	73.49	87.89	96.61	100.46	101.95	100.95	78.32	86.95	96.82	98.93	102.35	103.42
SD	3.50	3.50	3.98	2.09	1.65	2.12	5.26	4.91	2.61	2.45	5.60	2.55

**Tabela 19.** Procenat oslobođenog levotiroksin-natrijuma u acetatnom puferu pH 4.5, pri brzini obrtanja lopatice od 75 rpm

Tableta	Vreme (min)											
	T2						R					
	10	15	20	30	45	60	10	15	20	30	45	60
1	55.40	78.45	89.00	88.00	89.98	88.14	40.23	59.90	70.14	79.90	85.56	85.33
2	49.89	76.56	80.26	84.56	87.56	91.30	41.56	59.78	63.47	74.50	83.21	85.45
3	63.45	84.56	86.54	95.40	93.45	87.45	46.78	68.70	64.56	82.56	80.45	82.14
4	66.24	83.20	89.90	92.30	95.60	96.45	45.69	64.23	72.00	83.69	85.60	80.23
5	63.10	81.45	91.23	92.04	89.90	91.23	48.70	65.78	74.60	84.30	86.12	86.98
6	60.89	75.45	88.45	84.60	93.45	92.36	42.56	62.47	67.00	78.14	83.14	89.47
7	62.45	75.60	87.96	88.45	92.40	93.56	48.90	63.89	67.20	75.40	82.69	85.69
8	63.78	82.30	88.45	91.40	93.78	90.47	49.00	64.77	73.00	86.50	84.56	84.47
9	64.33	83.90	90.56	90.65	91.00	86.89	43.56	58.90	76.58	82.00	85.69	87.23
10	65.47	82.45	79.89	88.70	85.40	85.46	42.36	60.00	74.23	80.56	88.00	85.47
11	50.40	86.57	86.79	90.60	87.12	89.10	39.47	61.00	76.35	80.60	81.00	80.56
12	49.92	82.11	82.33	92.7	82.88	86.39	53.35	68.38	66.28	89.01	83.42	79.18
$\bar{x}_{sr}$	59.61	81.05	86.78	89.95	90.21	89.90	45.18	63.15	70.45	81.43	84.12	84.35
SD	6.36	3.67	3.88	3.24	3.84	3.26	4.24	3.36	4.63	4.23	2.21	3.16

**Tabela 20.** Procenat oslobođenog levotiroksin-natrijuma u fosfatnom puferu pH 6.8, pri brzini obrtanja lopatice od 75 rpm

Tableta	Vreme (min)											
	T2						R					
	10	15	20	30	45	60	10	15	20	30	45	60
1	67.80	79.80	88.70	87.89	99.47	100.20	59.90	79.90	84.50	84.56	93.40	94.70
2	65.00	84.23	95.60	96.55	98.40	99.90	58.70	78.47	88.90	94.50	95.40	93.40
3	72.30	86.45	92.30	96.47	94.56	99.78	64.50	82.50	90.10	93.14	94.99	96.02
4	71.45	84.99	87.99	95.87	97.56	98.40	65.90	81.45	84.50	92.14	92.40	95.07
5	72.56	80.14	91.56	93.42	94.69	102.30	66.00	83.60	86.70	95.69	96.60	93.47
6	66.89	78.40	92.36	96.49	99.47	101.45	62.40	77.40	85.69	95.47	96.01	96.60
7	67.10	87.45	93.45	94.40	101.20	100.56	63.14	78.90	89.90	92.14	94.52	92.40
8	63.70	86.14	90.47	97.12	97.56	97.40	61.40	83.56	88.47	91.23	93.14	97.20
9	62.30	82.14	88.90	98.14	99.23	99.47	65.40	74.50	81.30	93.70	95.50	96.40
10	72.30	85.00	92.36	96.47	100.54	98.30	63.89	82.40	89.90	96.40	92.47	96.40
11	74.60	85.67	87.80	93.24	99.99	97.80	65.40	79.80	93.40	93.14	92.30	98.90
12	74.28	87.59	91.23	96.94	102.45	94.36	60.81	78.96	90.84	95.33	97.99	99.88
$\bar{x}_{sr}$	69.19	84.00	91.06	95.25	98.76	99.16	63.12	80.12	87.85	93.12	94.56	95.87
SD	4.24	3.13	2.38	2.76	2.39	2.10	2.48	2.72	3.38	3.14	1.84	2.22



**Slika 9.** Uticaj pH vrednosti medijuma na brzinu rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz tableta (aparatura sa lopaticom pri 75 rpm): preparat T2 (a) i preparat R (b). Prikazane su srednje vrednosti  $\pm$  SD (n=12)

U skladu sa pH zavisnom rastvorljivošću levotiroksin-natrijuma, može se očekivati da će pH vrednost imati značajan uticaj i na njegovu brzinu rastvaranja iz tableta. Ovaj uticaj se jasno vidi iz profila brzine rastvaranja dobijenih u medijumima različitih pH vrednosti (slika 9). Najveća brzina rastvaranja i kompletno oslobađanje postignuto je u puferu pH 1.2 za obe ispitivane formulacije, sa više od 85% levotiroksin-natrijuma oslobođenog za 15 minuta. Količine rastvorenog levotiroksin-natrijuma su bile najniže u acetatnom puferu pH 4.5, takođe za obe formulacije, što se može objasniti nižom rastvorljivošću supstance u pH oblasti 4-5. Međutim, veća brzina rastvaranja je uočena u fosfatnom puferu pH 6.8, tako da je više od 85% lekovite supstance iz obe formulacije oslobođeno u intervalu od 15 do 20 minuta. Vrednosti faktora sličnosti za dobijene profile brzine rastvaranja su prikazane u tabeli 21.

**Tabela 21.** Izračunate vrednosti faktora sličnosti za ispitivane preparate u različitim medijumima

Medijum	$f_2$	
	T2	R
pH 1.2 vs. pH 4.5	48.7	31.3
pH 1.2 vs. pH 6.8	66.2	48.0
pH 4.5 vs. pH 6.8	59.8	41.6

### 5.1.3.2 Uticaj intenziteta mešanja na brzinu rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz tableta

Uticaj intenziteta mešanja na brzinu rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz tableta ispitan je na primeru razvojne formulacije i referentnog preparata primenom različitih brzina obrtanja u aparaturi sa rotirajućom lopaticom i aparaturi sa rotirajućom korpicom u fosfatnom puferu pH 6.8. Rezultati ispitivanja prikazani su u tabelama 20, 22 i 23 i na slici 10.

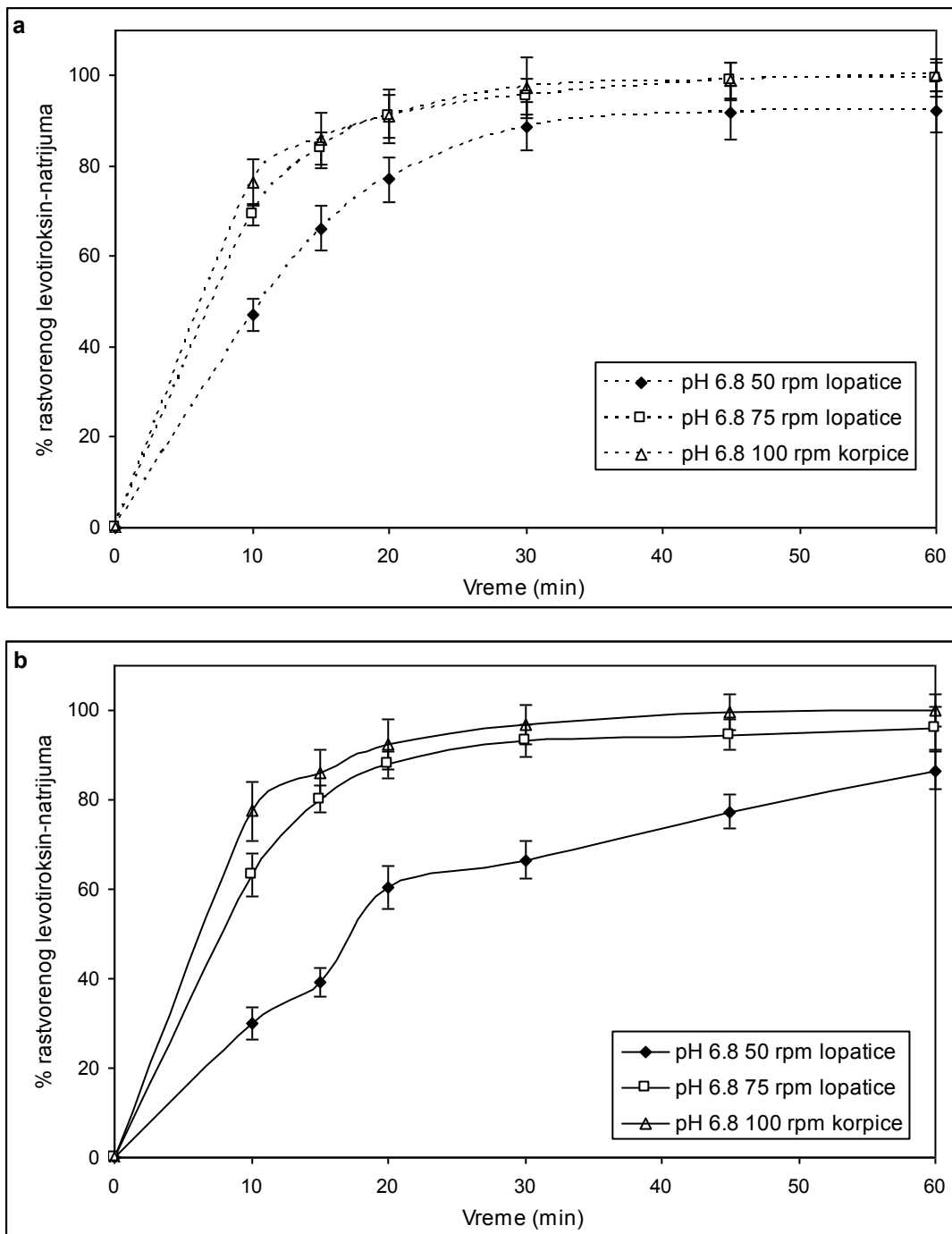
**Tabela 22.** Procenat oslobođenog levotiroksin-natrijuma u fosfatnom puferu pH 6.8, pri brzini obrtanja lopatice od 50 rpm

Tableta	Vreme (min)											
	T2						R					
	10	15	20	30	45	60	10	15	20	30	45	60
1	45.40	63.56	74.56	88.79	90.80	98.00	26.60	38.47	62.40	65.70	78.89	89.90
2	42.56	66.02	77.89	85.69	89.90	90.00	34.78	39.69	58.60	69.80	80.36	85.45
3	40.96	66.59	79.69	89.90	93.00	91.56	30.40	40.57	59.90	67.80	74.56	82.48
4	48.78	70.09	74.56	92.00	92.14	93.47	32.47	43.77	56.47	69.90	78.90	88.90
5	49.98	70.50	77.69	91.03	93.60	94.69	33.00	38.14	63.78	70.23	81.56	90.40
6	47.69	69.90	78.63	87.41	92.36	90.14	31.30	36.20	65.50	65.40	74.56	88.90
7	48.23	68.47	72.41	92.30	94.56	93.40	28.90	42.60	63.40	62.10	80.36	84.50
8	46.45	65.47	73.69	91.30	90.56	95.40	30.47	45.00	57.78	63.40	72.14	86.90
9	49.00	66.89	78.80	87.60	90.54	90.78	24.78	34.60	59.90	60.50	78.00	88.00
10	48.20	65.45	80.40	86.90	88.47	89.63	31.30	41.20	60.14	67.80	74.69	85.50
11	47.52	63.40	75.40	91.00	93.69	88.90	32.40	39.14	62.30	65.14	79.90	84.69
12	49.95	57.94	80.16	81.44	92.1	88.03	23.36	30.18	56.55	70.95	73.8	81.42
$\bar{x}_{sr}$	47.06	66.19	76.99	88.78	91.81	92	29.98	39.13	60.56	66.56	77.31	86.42
SD	2.82	3.53	2.74	3.17	1.79	3.00	3.46	4.10	2.93	3.41	3.16	2.89

**Tabela 23.** Procenat oslobođenog levotiroksin-natrijuma u fosfatnom puferu pH 6.8, pri brzini obrtanja korpice od 100 rpm

Tableta	Vreme (min)											
	T2						R					
	10	15	20	30	45	60	10	15	20	30	45	60
1	75.50	80.56	90.56	96.47	99.90	102.00	74.50	79.99	90.41	96.45	99.90	100.20
2	72.45	84.56	92.36	98.69	99.41	99.96	74.69	84.56	89.90	95.14	98.90	99.65
3	78.80	88.90	95.40	98.56	98.10	99.36	78.90	86.98	93.40	93.47	99.90	101.30
4	77.45	87.45	88.47	97.69	97.89	101.60	77.99	87.03	92.69	97.69	101.00	99.70
5	76.56	85.47	89.56	94.47	98.00	100.45	77.65	86.08	93.78	96.89	100.00	98.56
6	76.47	89.90	93.47	96.40	101.00	99.45	75.41	84.96	90.47	97.47	99.59	100.56
7	73.98	84.36	92.77	99.41	97.69	98.96	74.36	83.45	89.90	95.69	98.96	99.48
8	79.89	83.47	88.69	98.96	98.12	98.60	80.69	89.63	93.78	96.99	99.87	100.60
9	77.50	80.56	90.80	96.40	99.41	100.60	74.69	86.41	93.42	98.00	101.30	99.41
10	74.69	88.96	89.60	99.40	99.47	99.45	75.70	87.41	90.59	97.60	100.03	99.23
11	75.00	87.40	92.40	93.78	97.40	99.78	82.69	86.95	94.40	96.47	100.01	100.03
12	78.27	86.57	88.76	97.61	101.13	102.19	82.61	88.31	96.78	98.90	95.26	101.52
$\bar{x}_{sr}$	76.38	85.68	91.07	97.32	98.96	100.2	77.49	85.98	92.46	96.73	99.56	100.02
SD	2.15	3.11	2.20	1.86	1.28	1.19	3.13	2.51	2.19	1.45	1.52	0.86





**Slika 10.** Uticaj intenziteta mešanja na brzinu rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz tableta (medijum pH 6.8): preparat T2 (a) i preparat R (b). Prikazane su srednje vrednosti  $\pm$  SD (n=12)

Intenzitet mešanja i vrsta aparature mogu imati značajan uticaj na hidrodinamiku sistema za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance [167-169]. Manje brzine obrtanja mogu smanjiti reproduktivnost testa, sa druge strane, visoke brzine obrtanja mogu uzrokovati pojavu turbulencije. Intenzitet mešanja ima uticaj na brzinu oslobađanja levotiroksin-natrijuma iz obe formulacije (slika 10). Ovaj uticaj je posebno izražen u slučaju referentnog preparata, gde je primena manjih brzina mešanja dovela do sporog i nepotpunog oslobađanja levotiroksin-natrijuma iz tableta. Profili brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz razvojne formulacije bili su znatno brži nego u slučaju referentnog preparata i, uprkos izvesnim razlikama, manje podložni uticaju primenjenih eksperimentalnih uslova (slika 10). Pri svim ispitanim uslovima oslobađanje levotiroksin-natrijuma iz razvojne formulacije je bilo brzo, sa više od 85% leka oslobođenog za 30 minuta. Uticaj eksperimentalnih uslova ispitivanja bio je više izražen u slučaju referentnog preparata. Ovakvi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Pable i saradnika, koji su takođe pokazali da je generički preparat bio manje osetljiv na uticaj pH vrednosti medijuma u poređenju sa referentnim preparatom [18]. Profil brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz referentnog preparata dobijen u aparaturi sa korpicom može se smatrati sličnim sa profilom dobijenim pri ispitivanju u aparaturi sa lopaticom pri brzini obrtanja od 75 rpm ( $f_2=64.7$ ), dok se može smatrati različitim od profila dobijenog u aparaturi sa lopaticom pri brzini obrtanja od 50 rpm ( $f_2=23.2$ ). Profil brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz razvojne formulacije dobijen u aparaturi sa korpicom može se smatrati sličnim sa profilom dobijenim pri ispitivanju u aparaturi sa lopaticom pri brzini obrtanja od 75 rpm ( $f_2=53.4$ ), dok se može smatrati različitim od profila dobijenog u aparaturi sa lopaticom pri brzini obrtanja od 50 rpm ( $f_2=35.5$ ). Poređenje profila brzine rastvaranja dobijenih pri različitim brzinama obrtanja lopatice pokazalo je odsustvo sličnosti kod obe formulacije ( $f_2=25.1$  za referentni preparat i  $f_2=45.7$  za razvojnu formulaciju). Dobijene vrednosti faktora sličnosti date su u tabeli 24.

**Tabela 24.** Izračunate vrednosti faktora sličnosti za ispitivane preparate pri različitim brzinama mešanja

Brzina mešanja	$f_2$	Brzina mešanja	$f_2$	
	T2 vs. R		T2	R
100 rpm (korpice)	veoma brzo rastvaranje	100 rpm vs. 75 rpm	53.4	64.7
75 rpm (lopatice)	66.6	100 rpm vs. 50 rpm	35.5	23.2
50 rpm (lopatice)	36.7	75 rpm vs. 50 rpm	45.7	25.1

### 5.1.3.3 Ispitivanje brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz zbirnog uzorka tableta

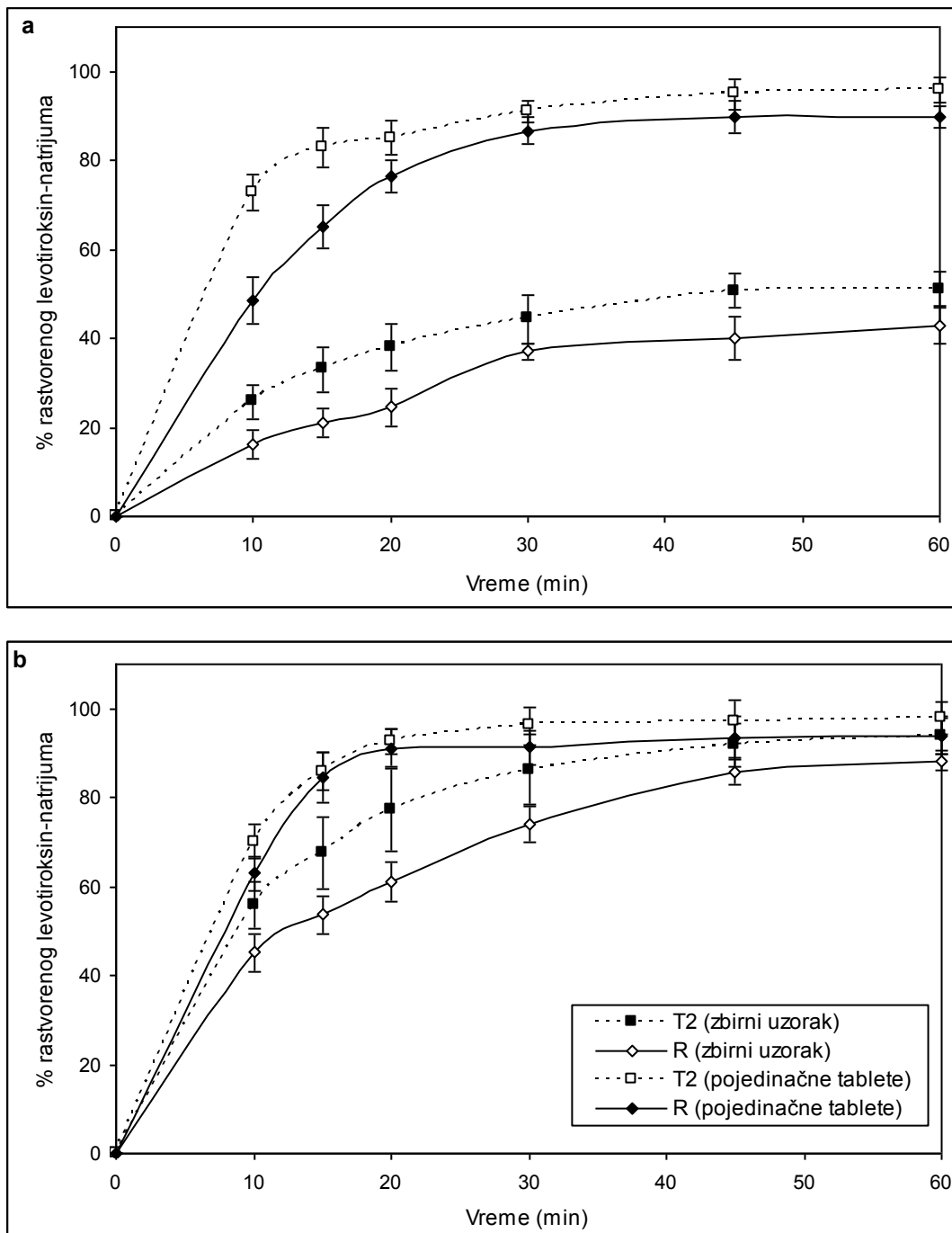
Rezultati uporednog ispitivanja brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz razvojne formulacije i referentnog preparata iz zbirnog uzorka od po 6 tableta po čaši aparata prikazani su u tabelama 25 i 26 i na slici 11.

**Tabela 25.** Procenat oslobođenog levotiroksin-natrijuma u fosfatnom puferu pH 7.4, pri brzini obrtanja lopatica od 100 rpm

Zbirni uzorak	Vreme (min)											
	T2						R					
	10	15	20	30	45	60	10	15	20	30	45	60
1	30.13	39.99	43.78	50.56	53.99	55.00	12.67	17.91	21.99	34.28	35.18	38.87
2	27.67	34.02	37.91	46.98	50.35	51.12	16.45	22.57	25.18	36.78	37.77	40.45
3	25.85	29.61	35.02	39.10	46.89	47.15	19.05	25.18	31.59	39.88	39.92	40.99
4	21.78	25.79	29.17	36.27	45.45	45.67	20.69	23.66	26.29	36.79	40.51	43.89
5	28.52	36.79	41.01	47.78	53.45	52.67	13.78	18.02	21.27	36.96	38.11	42.87
6	20.55	32.52	41.17	45.35	53.95	55.17	14.71	18.32	20.56	38.27	48.99	50.53
$\bar{x}_{sr}$	25.75	33.12	38.01	44.34	50.68	51.13	16.23	20.94	24.48	37.16	40.08	42.93
SD	3.83	5.06	5.28	5.50	3.77	3.98	3.13	3.24	4.15	1.86	4.75	4.13

**Tabela 26.** Procenat oslobođenog levotiroksin-natrijuma u 0.01 M HCl sa 0.2% NaLS, pri brzini obrtanja lopatica od 50 rpm

Zbirni uzorak	Vreme (min)											
	T2						R					
	10	15	20	30	45	60	10	15	20	30	45	60
1	57.34	63.88	70.44	79.98	89.91	92.12	47.21	54.67	56.56	70.56	84.02	87.56
2	47.12	57.96	66.13	74.99	83.64	87.78	43.78	54.19	60.98	72.91	82.99	86.12
3	53.06	65.34	74.39	85.91	91.28	94.99	51.97	59.03	68.78	80.59	88.70	90.59
4	55.91	63.72	76.83	86.89	92.78	93.45	41.04	49.87	59.98	75.91	88.00	90.47
5	61.78	73.89	85.04	92.91	94.78	95.02	46.33	57.03	62.06	74.73	87.99	89.59
6	59.47	79.97	91.33	96.34	98.11	99.74	40.33	47.65	57.57	69.66	82.56	85.55
$\bar{x}_{sr}$	55.78	67.46	77.36	86.17	91.75	93.85	45.11	53.74	60.99	74.06	85.71	88.31
SD	5.19	7.99	9.35	7.91	4.90	3.93	4.34	4.29	4.34	3.99	2.81	2.21



**Slika 11.** Uporedni profili brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz preparata T2 i R iz zbirnog uzorka od po 6 tableta po čaši aparata i iz pojedinačnog uzorka: u fosfatnom puferu pH 7.4 pri brzini obrtanja lopatica od 100 rpm (USP 24 metoda) (a) i u 0.01 M HCl sa 0.2% NaLS pri brzini obrtanja lopatica od 50 rpm (USP 34 metoda) (b). Prikazane su srednje vrednosti  $\pm$  SD (n=6)

Oslobađanje levotiroksin-natrijuma iz zbirnog uzorka od po šest tableta u 0.01 M HCl sa 0.2% NaLS je za oba preparata bilo evidentno sporije nego u slučaju kada je test brzine rastvaranja izveden sa pojedinačnim tabletama, pri čemu je više od 85% supstance oslobođeno nakon 30 minuta iz razvojne formulacije i nakon 45 minuta iz referentnog preparata. U oba slučaja je zadovoljen USP 34 zahtev za brzinu rastvaranja. Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja iz zbirnog uzorka u fosfatnom puferu pH 7.4 ukazali su na sporo i nepotpuno oslobađanje levotiroksin-natrijuma iz oba ispitivana preparata. Ovo se može objasniti ograničenom rastvorljivošću levotiroksin-natrijuma u dozi od 600 µg u ovom medijumu, usled čega nije zadovoljen USP 24 zahtev za brzinu rastvaranja. Izvođenje testa brzine rastvaranja sa više od jedne tablete po čaši aparata, generalno, nije preporučljivo. Međutim, na ovaj način simulirana je *in vivo* situacija u kojoj su ispitanici primili odjednom dozu od 6 ispitivanih tableta. Hidrodinamički uslovi koji postoje u standardnim aparaturama za izvođenje ovog testa su takvi da bilo kakve promene u poziciji tablete ili kapsule na dnu čaše ili promene na nivou dodirne površine između lekovitog oblika i medijuma mogu značajno da utiču na varijabilnost rezultata, što se pogrešno može pripisati lošem kvalitetu proizvoda [170].

#### **5.1.3.4 Uporedno ispitivanje brzine rastvaranja u skladu sa regulatornim zahtevima za *biowaiver***

Rezultati uporednog ispitivanja brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz razvojne formulacije, referentnog i uporednog generičkog preparata u medijumima različitih pH vrednosti, u skladu sa regulatornim preporukama za podnošenje zahteva za izostavljanje *in vivo* studije bioekvivalencije [35] prikazani su u tabelama 18-20 i 27-29 i na slikama 12-14. Razlike između profila brzine rastvaranja su bile izraženije u početnim vremenskim tačkama (nakon 10 i 15 minuta od početka ispitivanja) (slika 15), što je u skladu sa rezultatima prikazanim u radu Pabla i saradnika [18].

**Tabela 27.** Procenat oslobođenog levotiroksin-natrijuma u hidrohloridnom medijumu pH 1.2, pri brzini obrtanja lopatice od 75 rpm

Tableta	Vreme (min)					
	G					
	10	15	20	30	45	60
1	83.12	92.89	96.47	99.90	100.90	102.00
2	80.00	89.02	98.69	99.41	102.12	99.96
3	78.80	93.09	98.56	98.10	99.89	99.36
4	84.12	93.12	97.69	100.12	101.55	101.60
5	82.78	92.67	94.47	99.99	101.49	100.45
6	79.98	89.66	96.40	101.00	100.12	101.69
7	78.56	94.11	99.41	97.69	102.02	101.48
8	79.89	92.08	98.96	100.05	101.00	103.34
9	81.23	90.01	96.40	99.41	100.78	102.05
10	80.99	88.96	99.40	101.12	101.79	101.78
11	78.19	92.46	93.32	98.10	101.40	100.89
12	79.06	94.61	95.07	101.26	100.50	103.40
$\bar{x}_{sr}$	80.56	91.89	97.07	99.68	101.13	101.50
SD	1.93	1.97	2.04	1.20	0.72	1.21

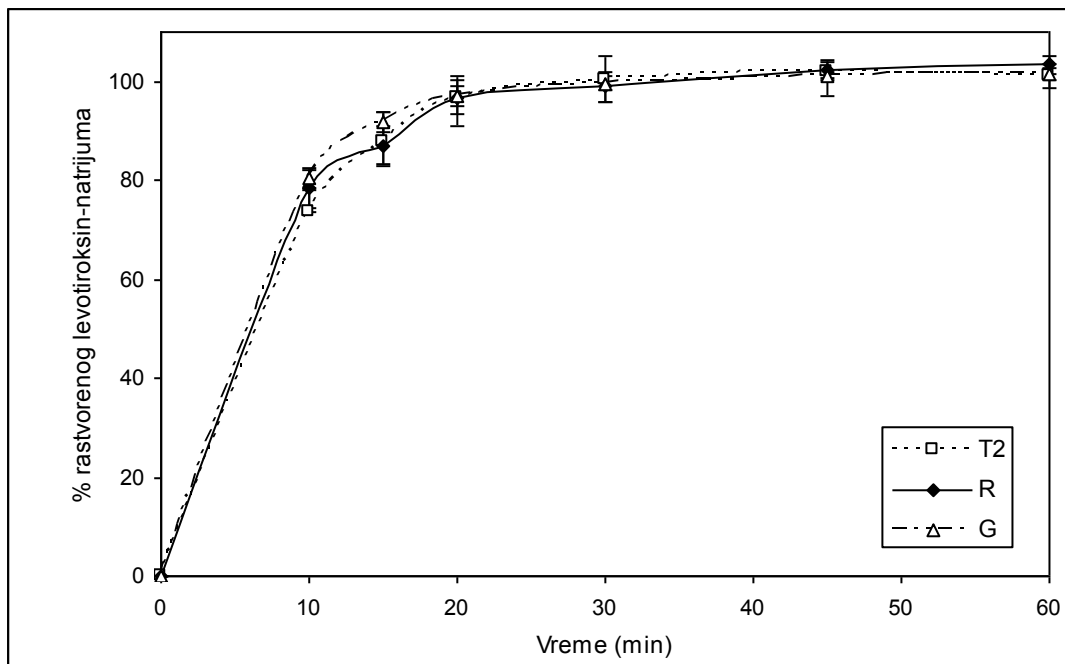


**Tabela 28.** Procenat oslobođenog levotiroksin-natrijuma u acetatnom puferu pH 4.5, pri brzini obrtanja lopatice od 75 rpm

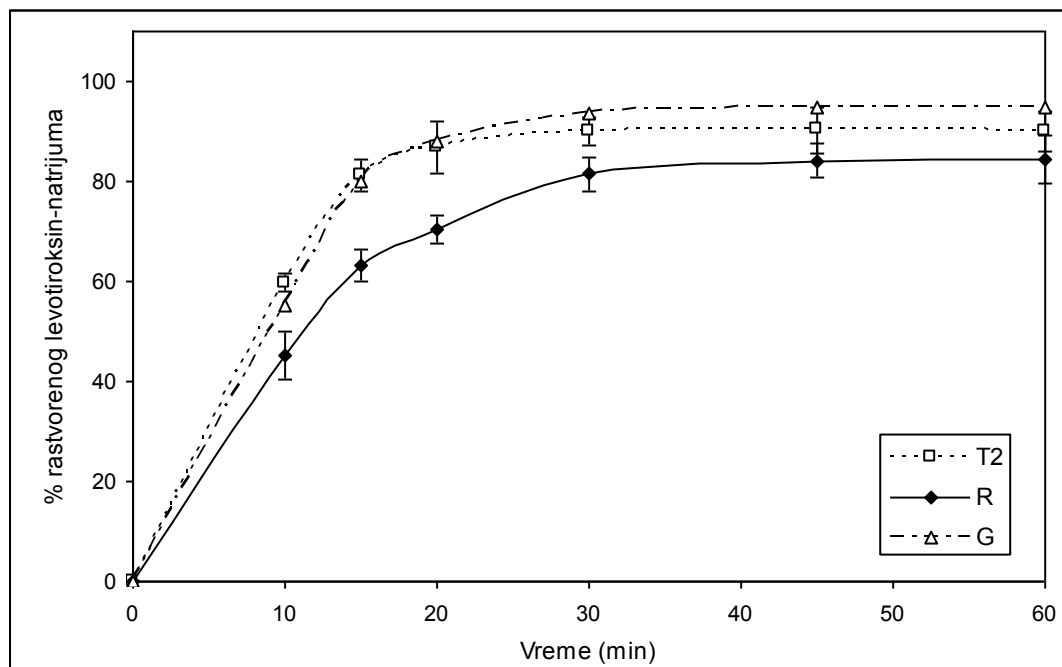
Tableta	Vreme (min)					
	G					
	10	15	20	30	45	60
1	45.09	81.03	85.00	95.06	95.67	95.02
2	50.71	79.98	85.54	96.05	97.15	97.11
3	66.55	76.99	88.05	92.21	93.90	93.94
4	60.24	83.46	90.19	90.98	92.22	93.20
5	52.98	75.96	89.74	93.62	94.29	93.55
6	55.74	79.4	85.48	95.84	96.02	96.54
7	47.06	81.18	83.91	90.72	94.12	95.04
8	61.11	78.05	92.23	98.01	98.11	98.00
9	58.94	86.93	93.00	94.53	95.56	95.89
10	60.75	77.02	90.67	92.16	93.41	93.91
11	56.48	79.36	87.07	88.77	90.75	91.12
12	48.43	82.08	87.4	96.09	96.64	96.68
x <sub>sr</sub>	55.34	80.12	88.19	93.67	94.82	95.00
SD	6.57	3.10	2.97	2.73	2.12	1.96

**Tabela 29.** Procenat oslobođenog levotiroksin-natrijuma u fosfatnom puferu pH 6.8, pri brzini obrtanja lopatice od 75 rpm

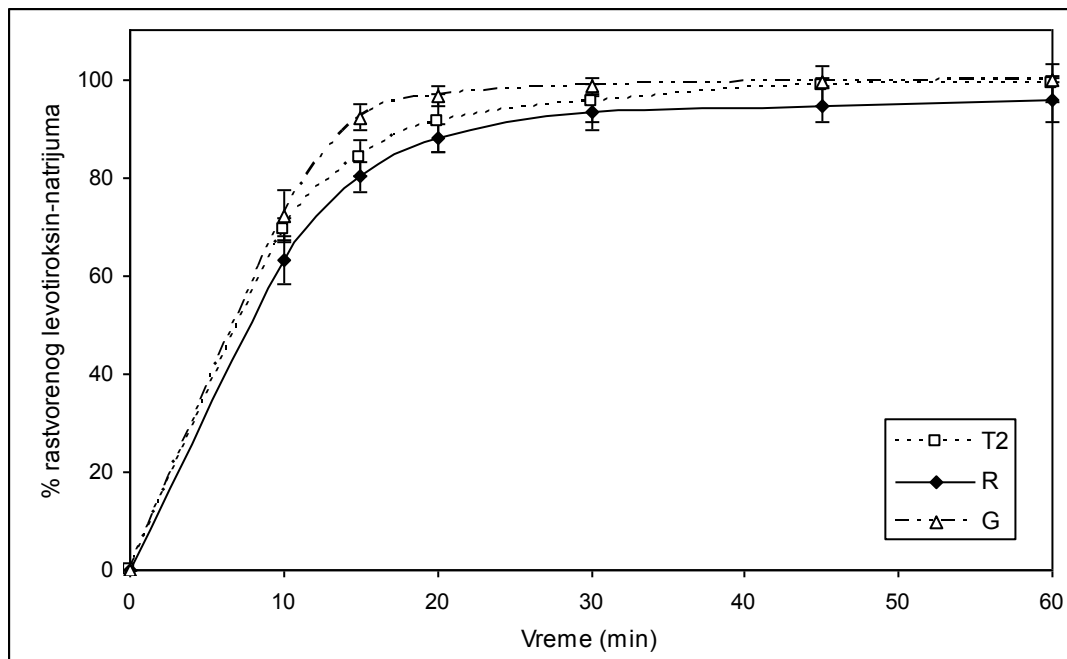
Tableta	Vreme (min)					
	G					
	10	15	20	30	45	60
1	72.41	96.04	96.78	97.02	99.99	100.05
2	77.98	93.18	97.91	99.73	99.99	100.12
3	80.12	87.88	94.98	96.49	96.99	99.01
4	69.12	94.59	99.32	100.74	99.98	100.63
5	71.06	93.22	95.15	97.00	99.97	100.19
6	73.55	89.78	92.64	98.50	98.87	99.88
7	68.93	94.07	98.15	99.50	99.94	100.05
8	76.74	95.47	97.88	98.53	98.55	99.93
9	75.00	89.71	98.27	101.92	100.34	100.00
10	67.11	91.73	94.48	98.29	98.88	99.53
11	73.90	90.34	94.59	97.49	99.86	100.48
12	61.80	89.43	96.65	98.83	99.68	100.01
x <sub>sr</sub>	72.31	92.12	96.40	98.67	99.42	99.99
SD	5.09	2.67	2.01	1.61	0.95	0.42



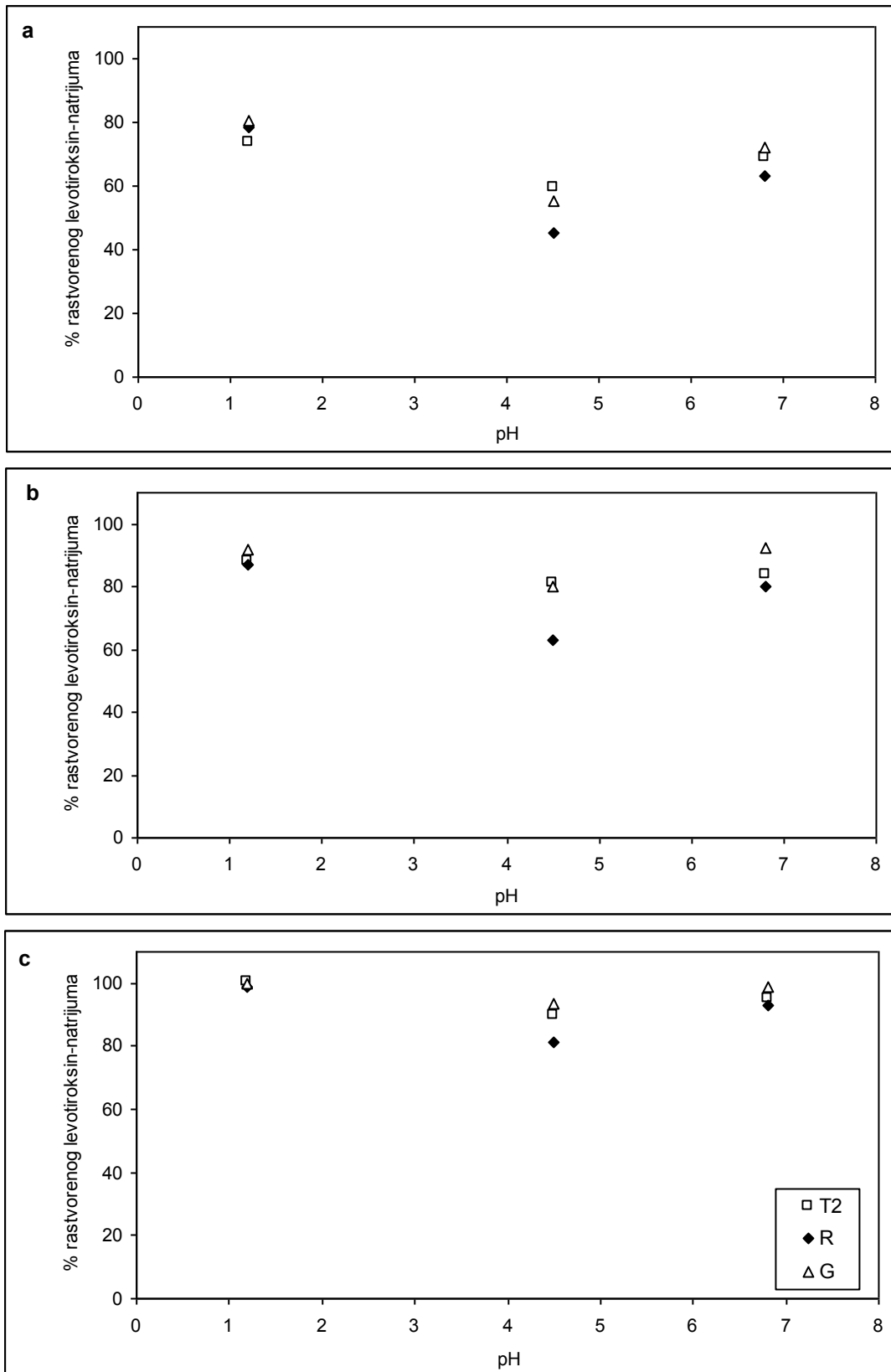
**Slika 12.** Uporedni profili brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz preparata T2, R i G u hidrohloridnom medijumu pH 1.2. Prikazane su srednje vrednosti  $\pm$  SD (n=12)



**Slika 13.** Uporedni profili brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz preparata T2, R i G u acetatnom puferu pH 4.5. Prikazane su srednje vrednosti  $\pm$  SD (n=12)



**Slika 14.** Uporedni profili brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz preparata T2, R i G u fosfatnom puferu pH 6.8. Prikazane su srednje vrednosti  $\pm$  SD (n=12)



**Slika 15.** Poređenje procenta rastvorenog levotiroksin-natrijuma iz ispitivanih preparata pri pH 1.2, 4.5 i 6.8 nakon 10 minuta (a), 15 minuta (b) i 30 minuta (c)

Rezultati uporednog ispitivanja ukazuju na slično ponašanje svih ispitivanih preparata u medijumu pH 1.2, pri čemu je zadovoljen kriterijum za "veoma brzo rastvaranje", pa se dobijeni profili mogu smatrati sličnim bez potrebe za izračunavanjem  $f_2$  vrednosti. Razvojna formulacija i referentni preparat pokazuju slično ponašanje i u USP fosfatnom puferu pH 6.8 ( $50 < f_2 < 100$ ) (tabela 30), dok u ovom medijumu uporedni preparat pokazuje slično ponašanje samo sa razvojnom formulacijom. Sa druge strane, izračunata vrednost faktora sličnosti ukazuje na različitost profila dobijenih ispitivanjem brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz razvojne formulacije i referentnog preparata u USP acetatnom puferu pH 4.5 ( $f_2=45.2$ ). U ovom medijumu su uočene razlike i između uporednog i referentnog preparata ( $f_2=43.5$ ). Razlike su bile izraženije u početnim vremenskim intervalima, sa više od 85% rastvorenog levotiroksin-natrijuma nakon 20 minuta u slučaju razvojne formulacije i uporednog preparata i nakon 30 minuta u slučaju referentnog preparata. U svim ispitanim slučajevima oslobađanje levotiroksin-natrijuma je bilo nešto brže iz razvojne formulacije u odnosu na referentni preparat (slike 12-14).

**Tabela 30.** Izračunate vrednosti faktora sličnosti za ispitivane preparate u različitim medijumima

Medijum	$f_2$		
	T2 vs. R	T2 vs. G	R vs. G
pH 1.2	veoma brzo	veoma brzo	veoma brzo
	rastvaranje	rastvaranje	rastvaranje
pH 4.5	45.2	77.4	43.5
pH 6.8	66.6	61.2	49.8

Faktori formulacije mogu imati bitnu ulogu u procesu oslobađanja aktivne supstance iz ispitivanog preparata, kako *in vitro*, tako i *in vivo*. Prisustvo superdezintegratora u formulaciji može imati veliki uticaj na oslobađanje leka iz čvrstog lekovitog oblika. Kroskarmeloza-natrijum je superdezintegrator koji se obično koristi u nižim koncentracijama od konvencionalnih dezintegratora [171-173]. Ima fibroznu strukutru i veliku sposobnost bubrenja u kontaktu sa vodom, što dovodi do brze dezintegracije tableta. Kroskarmeloza-natrijum je prisutna i u razvojnoj formulaciji i u

referentnom preparatu i verovatno je odgovorna za dobro i brzo oslobađanje levotiroksina iz ispitivanih formulacija pod odgovarajućim uslovima. Prisustvo istih ekscipijenasa u obe formulacije je u skladu sa zahtevima trenutno važećih regulatornih smernica za izvođenje studije bioekvivalencije, u kojima su date preporuke da test i referentni preparat treba da budu slični po sastavu pomoćnih supstanci i, koliko god je to moguće, i po njihovom međusobnom odnosu [35]. Brzo oslobađanje levotiroksin-natrijuma uočeno kod uporednog preparata je posledica prisustva natrijum-skrobglikolata, koji takođe spada u superdezintegratore. Dobijeni rezultati ukazuju da je različito *in vitro* ponašanje ispitivanih preparata posledica razlika u sastavu tabletno formulacije i primenjenoj tehnologiji izrade. Za izradu razvojne formulacije korišćen je mikronizirani levotiroksin-natrijum veličine čestica od 10 µm, usled čega je postignuta velika kontaktna površina u medijumu za rastvaranje. Želatina kao vezivno sredstvo je obezbedila dobijanje granulata željenog granulometrijskog sastava, sa malo sitnog praška, koji se lako komprimuje. Ispitivanja u toku optimizacije formulacije, vršena sa različitim sredstvima za raspadanje (skrob, natrijum-skrobglikolat, mikrokristalna celuloza, kroskarmeloza-natrijum), pokazala su da se najbolji efekti postižu sa mešavinom kukuruznog skroba i dela kroskarmeloze-natrijum koja se inkorporira intragranularno. Značajan uticaj na vreme raspadanja tableta ima dodatak jednog dela kroskarmeloze-natrijum ekstragranularno.

Sličnost profila brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz ispitivanih formulacija potvrđena je u USP hidrohloridnom medijumu pH 1.2, USP fosfatnom puferu pH 6.8 i 0.01 M HCl sa 0.2% NaLS. Izvođenje testa brzine rastvaranja u skladu sa uslovima iz USP 24 (u fosfatnom puferu pH 7.4) ukazalo je na evidentne razlike između dobijenih profila. Oslobađanje levotiroksin-natrijuma iz referentnog preparata bilo je sporije i postepenije nego u slučaju razvojne formulacije. Uočene razlike bile su upadljivije u početnim vremenskim intervalima, ali je već nakon 30 minuta iz obe formulacije oslobođeno više od 85% lekovite supstance. Uporedni preparat je pokazao različito ponašanje sa referentnim preparatom u acetatnom puferu pH 4.5 i fosfatnim puferima pH 6.8 i 7.4, dok je sa razvojnom formulacijom pokazao slično ponašanje u svim ispitivanim medijumima. *In vitro* test brzine rastvaranja može da ukaže na razlike između ispitivanih preparata koje nisu uočene u *in vivo* studiji, što se i može zaključiti na osnovu dobijenih rezultata. U literaturi se mogu naći brojni radovi u kojima

formulacije sa dokazanom bioekvivalentnošću pokazuju razlike u *in vitro* profilima brzine rastvaranja (na osnovu izračunatih  $f_2$  vrednosti) [27, 160, 174]. U radu Volpata i saradnika test brzine rastvaranja izveden u skladu sa uslovima datim u USP 24 je pokazao značajne razlike između dve formulacije tableta levotiroksina za koje je prethodno utvrđena bioekvivalencija *in vivo*, dok su profili brzine rastvaranja dobijeni prema USP 34 uslovima bili skoro identični [27]. Dobijeni rezultati ispitivanja rastvorljivosti pokazuju da levotiroksin zadovoljava kriterijum za visoko rastvorljivu supstancu u opsegu terapijskih doza, kao i da ne ispunjava ovaj kriterijum pri dozi koja se koristi u studijama bioekvivalencije. Za levotiroksin je specifično da je to lek kod koga se u studijama bioekvivalencije različitih formulacija koristi doza znatno veća od kliničkih doza, da bi se redukovao uticaj endogenog nivoa levotiroksina na procenu bioekvivalencije. Dalje, u literaturi se može naći nekoliko studija u kojima je dokazana bioekvivalencija između tableta levotiroksina i oralnog rastvora levotiroksina, što ukazuje da biološka raspoloživost levotiroksina iz tableta ne zavisi od faktora formulacije [175-179]. Walter-Sack i saradnici su potvrdili bioekvivalentnost tableta levotiroksina različitih jačina sa rastvorom levotiroksina kao referentnim preparatom kroz osam različitih studija bioekvivalencije, pri čemu je primenjena metoda i bez i sa korekcijom koncentracije levotiroksina u odnosu na endogeni nivo [179]. Leggio i saradnici su u svojoj studiji pokazali bioekvivalentnost između rastvora levotiroksina i tableta levotiroksina, pri čemu je korišćen isti referentni preparat kao u ovom istraživanju [178]. Može se očekivati da su brzina i stepen resorpcije levotiroksina verovatno pre ograničeni njegovom permeabilnošću, a ne njegovom rastvorljivošću i brzinom rastvaranja. U skladu sa navedenim, trenutni regulatorni zahtevi za uporedno ispitivanje brzine rastvaranja, koji podrazumevaju veoma brzo rastvaranje (više od 85% lekovite supstance oslobođene za 15 minuta) i  $f_2$  vrednost veću od 50, se mogu smatrati previše strogim i ograničavajućim [79]. Granična vrednost 50 za  $f_2$  je dobijena na osnovu sličnosti profila brzine rastvaranja za koje je dozvoljeno da pokazuju najviše 10% razlike u svakoj od vremenskih tačaka [180]. Može se postaviti pitanje koliko bi mogla biti velika razlika između srednjih profila brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata, a da, pri tome, nema uticaja na njegovo *in vivo* ponašanje. Uzimajući u obzir da je levotiroksin visoko rastvorljiva supstanca, razlike uočene *in vitro* najverovatnije nemaju značajan uticaj na *in vivo* ponašanje leka. Vrednosti  $f_2$  izračunate poređenjem

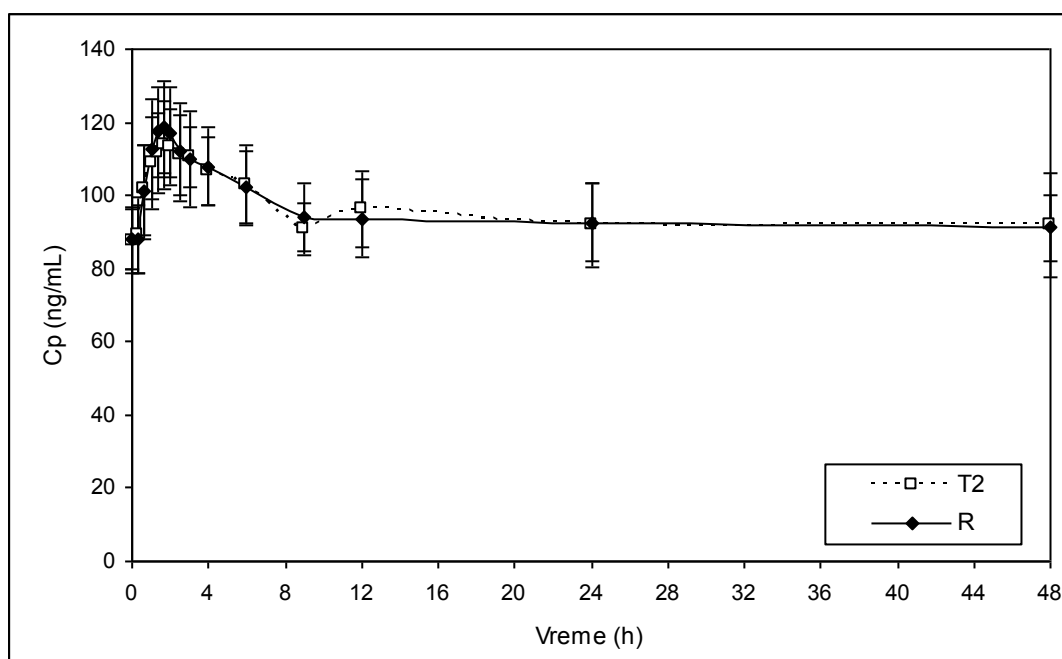


profila brzine rastvaranja različitih preparata, pod različitim eksperimentalnim uslovima, u svakom slučaju su bile veće od 40. Stoga bi trebalo razmotriti mogućnost primene manje restriktivnih kriterijuma za procenu sličnosti između formulacija, pri čemu bi se, u ovom slučaju, mogla prihvatiti prosečna razlika od 10% do 16% između *in vitro* tačaka. Ovakvi rezultati idu u prilog debati o validnosti postojećih kriterijuma za  $f_2$  vrednosti kada je u pitanju uporedno ispitivanje brzine rastvaranja lekovitih oblika sa trenutnim oslobađanjem aktivne supstance [82-84]. Polli i saradnici predlažu da se kritična  $f_2$  vrednost za utvrđivanje sličnosti profila brzine rastvaranja može smanjiti uz odgovarajuće dokaze [83]. Dodatna istraživanja koja bi uključivala veći broj lekovitih supstanci i preparata su svakako potrebna da bi se opravdala mogućnost primene manje strogih kriterijuma za sličnost profila brzine rastvaranja kada su u pitanju lekoviti oblici sa trenutnim oslobađanjem koji sadrže visoko rastvorljive lekovite supstance.

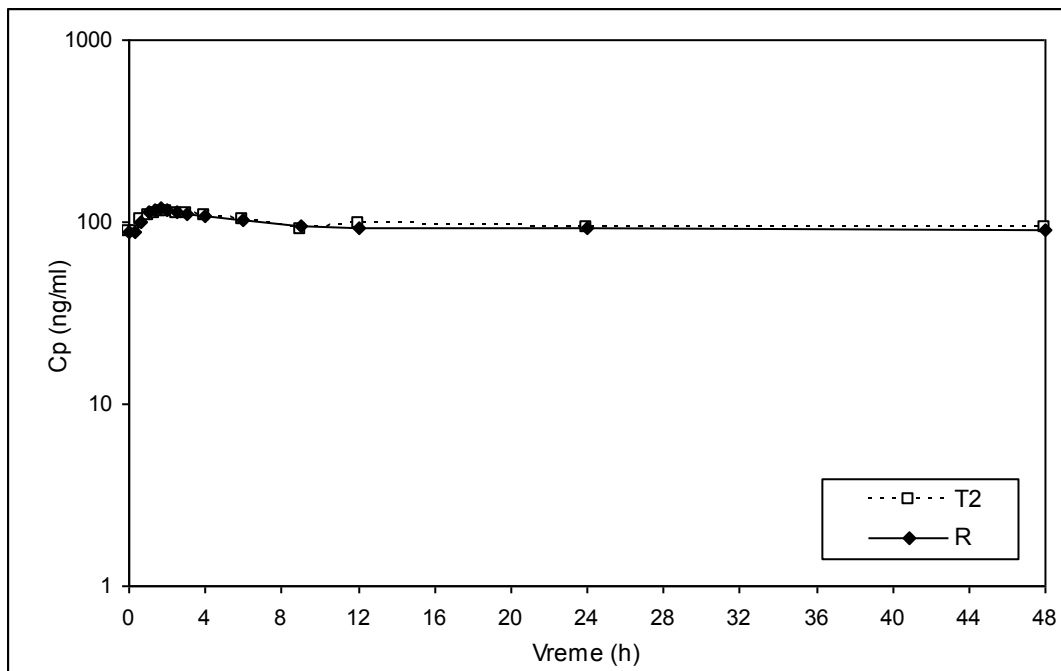
## 5.2 IN VIVO ISPITIVANJE

U studiju je uključeno 24 ispitanika, od kojih je 22 ispitanika završilo studiju. Dva ispitanika su odlučila da napuste studiju zbog pojave glavobolje nakon primene leka u prvom periodu studije.

Rezultati ispitivanja koncentracije levotiroksina u plazmi zdravih dobrovoljaca u funkciji vremena nakon pojedinačne primene ispitivanih preparata bez korekcije u odnosu na endogeni nivo hormona, kao i odgovarajuće srednje vrednosti, prikazani su tabelarno za svakog dobrovoljca pojedinačno (tabele 31 i 32). Profili srednjih vrednosti koncentracija levotiroksina u funkciji vremena prikazani su na slikama 16 i 17.



**Slika 16.** Profili srednjih vrednosti koncentracija ( $\pm$  SD) levotiroksina nakon primene ispitivanih preparata (bez korekcije u odnosu na endogeni nivo)



**Slika 17.** Profili srednjih vrednosti koncentracija levotiroksina nakon primene ispitivanih preparata (bez korekcije u odnosu na endogeni nivo)-logaritamska skala

Nakon oralne primene ispitivanih preparata u uslovima na gladno uočena je brza resorpcija levotiroksina. Koncentracije izmerene nakon 20 minuta od trenutka primene leka su bile 89.2 ng/ml (test formulacija) i 88 ng/ml (referentni preparat). Najviše koncentracije kod većine ispitanika izmerene su za oba preparata 1.66 h posle njihove primene. Izmerene koncentracije levotiroksina 9 sati nakon primene ispitivanih preparata bile su 90.0 ng/ml u slučaju test formulacije i 94.0 ng/ml u slučaju referentnog preparata. Srednja maksimalna koncentracija levotiroksina iznosila je  $113.9 \pm 12.0$  ng/ml za test formulaciju i  $118.6 \pm 12.6$  ng/ml za referentni preparat. Vrednosti farmakokinetičkih parametara posle oralne primene ispitivanih tableta sa trenutnim oslobađanjem levotiroksina prikazane su za svakog ispitanika pojedinačno u tabeli 33, dok su srednje vrednosti farmakokinetičkih parametara i rezultati deskriptivne statističke analize prikazani u tabeli 34.

**Tabela 31.** Koncentracije levotiroksina (ng/ml) posle oralne primene test formulacije

Dobrovoljac	Vreme (h)														
	0	0.33	0.66	1	1.33	1.66	2	2.5	3	4	6	9	12	24	48
1	87.5	93.7	106.0	114.0	114.0	114.0	107.0	103.0	106.0	105.0	95.6	92.4	92.7	83.7	90.3
2	93.4	87.4	95.0	97.6	96.0	109.0	112.0	101.0	99.0	101.0	94.9	94.3	111.0	96.4	88.0
4	82.7	94.2	94.1	88.0	90.2	95.8	102.0	93.3	104.0	99.6	101.0	90.3	89.4	92.3	88.5
5	84.2	90.3	97.2	101.0	110.0	119.0	121.0	109.0	108.0	100.0	99.1	81.7	98.5	102.0	97.6
7	86.2	87.1	96.0	102.0	124.0	110.0	104.0	113.0	106.0	103.0	96.9	80.6	97.6	82.4	92.3
8	87.6	77.7	91.0	109.0	102.0	115.0	115.0	107.0	105.0	110.0	102.0	92.3	92.0	83.7	81.5
9	74.8	88.8	99.6	98.3	105.0	98.2	108.0	97.7	95.0	94.9	105.0	82.1	80.1	64.1	64.1
10	95.5	106.0	114.0	116.0	109.0	111.0	110.0	116.0	106.0	104.0	92.8	84.6	104.0	93.1	109.0
11	90.0	88.0	82.9	99.9	111.0	113.0	106.0	113.0	114.0	107.0	93.1	88.9	91.4	85.5	85.7
12	104.1	92.3	122.0	127.0	121.0	124.0	131.0	122.0	121.0	116.0	106.0	89.6	119.0	108.0	115.0
13	98.2	101.0	120.0	106.0	126.0	125.0	123.0	107.0	113.0	104.0	103.0	95.0	91.2	103.0	100.0
14	80.4	86.0	114.0	107.0	104.0	95.1	104.0	98.6	97.7	88.8	92.4	77.0	82.6	90.2	76.6
15	85.8	76.7	101.0	112.0	113.0	140.0	134.0	116.0	119.0	112.0	104.0	101.0	101.0	84.8	89.3
16	73.6	76.8	97.6	105.0	105.0	118.0	100.0	102.0	109.0	98.3	89.6	92.5	79.0	86.4	83.0
17	75.5	80.1	89.4	100.0	107.0	96.9	104.0	115.0	112.0	117.0	110.0	96.3	94.7	84.4	74.3
18	75.6	75.8	78.0	91.6	96.0	101.0	96.7	94.9	107.0	92.0	95.6	81.6	81.2	82.9	75.2
19	97.7	99.2	109.0	143.0	133.0	134.0	119.0	124.0	127.0	116.0	117.0	93.6	105.0	103.0	97.7
20	86.4	67.1	84.0	99.5	107.0	109.0	112.0	126.0	122.0	123.0	122.0	99.6	102.0	102.0	119.0
21	81.5	89.7	113.0	116.0	119.0	117.0	115.0	122.0	110.0	118.0	101.0	91.1	97.7	90.5	96.0
22	99.1	104.0	120.0	122.0	124.0	116.0	122.0	116.0	118.0	107.0	102.0	97.2	99.0	91.0	81.1
23	86.7	100.0	106.0	120.0	118.0	117.0	125.0	111.0	115.0	111.0	101.0	96.5	103.0	93.8	107.0
24	99.5	99.5	103.0	117.0	123.0	128.0	120.0	136.0	113.0	120.0	136.0	101.0	109.0	121.0	111.0
$x_{sr}$	87.6	89.2	101.5	108.7	111.7	113.9	113.2	111.1	110.3	106.7	102.7	90.9	96.4	92.0	91.9
SD	8.8	10.3	12.5	12.6	11.0	12.0	10.2	11.0	8.1	9.3	10.8	7.0	10.4	11.6	14.3

**Tabela 32.** Koncentracije levotiroksina (ng/ml) posle oralne primene referentnog preparata

Dobrovoljac	Vreme (h)														
	0	0.33	0.66	1	1.33	1.66	2	2.5	3	4	6	9	12	24	48
1	80.2	82.0	92.3	99.2	118.0	118.0	116.0	116.0	102.0	100.0	91.1	90.1	70.9	102.0	94.9
2	82.7	73.5	83.7	107.0	91.2	99.0	98.1	90.0	82.1	92.3	110.0	86.2	76.3	92.0	88.8
4	94.3	95.9	97.4	95.2	117.0	118.0	114.0	108.0	107.0	104.0	100.0	96.0	99.2	103.0	86.6
5	93.3	88.7	113.0	122.0	126.0	128.0	130.0	133.0	108.0	106.0	96.3	94.2	92.9	100.0	99.9
7	85.4	93.1	104.0	112.0	109.0	104.0	111.0	107.0	99.0	96.7	95.6	76.4	83.1	82.1	87.8
8	87.1	82.5	96.1	100.0	105.0	110.0	118.0	103.0	112.0	101.0	94.9	92.9	91.6	83.9	97.4
9	72.8	70.8	85.1	102.0	101.0	100.0	102.0	95.0	109.0	91.5	86.5	78.5	79.7	70.4	65.4
10	90.8	89.7	103.0	108.0	112.0	106.0	118.0	100.0	107.0	99.9	91.9	85.6	86.7	96.8	100.0
11	79.1	79.0	86.9	105.0	116.0	117.0	120.0	119.0	117.0	112.0	96.8	97.2	100.0	78.9	77.3
12	101.5	101.0	99.9	131.0	122.0	123.0	124.0	127.0	111.0	117.0	109.0	104.0	102.0	109.0	97.0
13	104.5	106.0	107.0	117.0	126.0	131.0	142.0	123.0	126.0	118.0	113.0	109.0	106.0	88.3	92.8
14	79.9	83.3	91.8	98.3	107.0	112.0	90.9	91.2	95.0	94.0	86.5	91.1	97.7	93.3	94.1
15	87.1	81.1	111.0	127.0	136.0	144.0	124.0	133.0	138.0	120.0	110.0	104.0	99.2	100.0	93.6
16	77.0	79.9	104.0	121.0	134.0	127.0	123.0	114.0	102.0	111.0	103.0	91.9	89.3	95.4	87.8
17	85.4	91.4	101.0	115.0	130.0	136.0	129.0	110.0	119.0	116.0	104.0	89.3	85.5	92.8	84.4
18	88.7	81.7	90.3	97.9	112.0	101.0	110.0	99.1	101.0	103.0	103.0	88.7	88.0	69.8	84.7
19	94.0	94.9	119.0	139.0	133.0	127.0	129.0	130.0	119.0	121.0	117.0	108.0	105.0	91.1	101.0
20	81.9	82.1	75.3	90.5	98.5	109.0	102.0	111.0	102.0	114.0	104.0	101.0	98.8	92.3	92.3
21	86.3	93.7	106.0	114.0	114.0	114.0	107.0	103.0	106.0	105.0	95.6	92.4	92.7	90.0	83.1
22	97.6	102.0	112.0	135.0	131.0	126.0	119.0	105.0	103.0	115.0	113.0	94.7	109.0	94.7	97.3
23	88.2	88.3	111.0	120.0	115.0	129.0	126.0	118.0	116.0	106.0	106.0	86.2	93.8	102.0	93.6
24	103.0	94.6	131.0	123.0	128.0	131.0	127.0	130.0	140.0	133.0	124.0	110.0	113.0	109.0	107.0
$x_{sr}$	88.2	88.0	100.9	112.7	117.4	118.6	117.3	112.1	110.1	108.0	102.3	94.0	93.7	92.6	91.2
SD	8.5	9.2	12.9	13.6	12.4	12.6	12.1	13.4	13.2	10.6	9.9	9.2	10.7	10.6	9.0

**Tabela 33.** Farmakokinetički parametri izračunati bez korekcije koncentracije levotiroksina u odnosu na endogeni nivo

Dobrovoljac	T2						R					
	C <sub>max</sub>	PIK <sub>0-t</sub>	PIK <sub>0-∞</sub>	t <sub>max</sub>	k <sub>el</sub>	t <sub>1/2</sub>	C <sub>max</sub>	PIK <sub>0-t</sub>	PIK <sub>0-∞</sub>	t <sub>max</sub>	k <sub>el</sub>	t <sub>1/2</sub>
1	114.0	819.47	4594.40	1.00	0.0247	28.10	118.0	865.80	4901.08	1.33	0.0219	31.58
2	112.0	863.55	5000.67	2.00	0.0128	54.11	110.0	841.93	5624.62	6.00	0.0190	36.46
3	104.0	858.79	5187.27	3.00	0.0211	32.77	118.0	906.44	6318.27	1.67	0.0176	39.25
4	121.0	878.98	3978.56	2.00	0.0430	16.10	133.0	935.61	4771.70	2.50	0.0242	28.67
5	124.0	870.17	2574.81	1.33	0.0478	14.48	112.0	846.91	2430.05	1.00	0.0493	14.06
6	115.0	903.83	3541.27	1.67	0.0349	19.83	118.0	877.58	3987.78	2.00	0.0159	43.43
7	108.0	856.61	3438.05	2.00	0.0331	20.90	109.0	796.21	3349.80	3.00	0.0308	22.52
8	116.0	883.78	3017.09	1.00	0.0394	17.60	118.0	860.57	3212.40	2.00	0.0359	19.30
9	114.0	877.88	2952.78	3.00	0.0417	16.60	120.0	921.28	4573.15	2.00	0.0260	26.66
10	131.0	975.51	4967.89	2.00	0.0482	14.38	131.0	994.98	5501.80	1.00	0.0229	30.23
11	126.0	938.41	4701.39	1.33	0.0252	27.51	142.0	1034.13	5914.93	2.00	0.0220	31.42
12	114.0	814.55	3114.80	0.67	0.0342	20.27	112.0	812.93	3123.67	1.67	0.0085	81.91
13	140.0	963.89	4750.03	1.67	0.0262	26.44	144.0	1032.69	3407.76	1.67	0.0425	16.29
14	118.0	852.34	4466.11	1.67	0.0246	28.13	134.0	935.52	3368.16	1.33	0.0378	18.34
15	117.0	937.78	3394.43	4.00	0.0394	17.61	136.0	957.36	2776.35	1.67	0.0492	14.08
16	107.0	815.06	3993.31	3.00	0.0263	26.39	112.0	877.35	3740.86	1.33	0.0314	22.03
17	143.0	1020.07	3087.95	1.00	0.0463	14.96	139.0	1048.61	3789.00	1.00	0.0230	30.08
18	126.0	995.88	3294.38	2.50	0.0442	15.68	114.0	909.00	5236.52	4.00	0.0231	30.04
19	122.0	942.73	2726.55	2.50	0.0504	13.76	114.0	891.47	3004.37	1.00	0.0244	28.36
20	124.0	954.21	4274.96	1.33	0.0288	24.07	135.0	978.63	3358.53	1.00	0.0404	17.15
21	125.0	944.84	4138.65	2.00	0.0298	23.26	129.0	939.91	3987.56	1.67	0.0435	15.92
22	136.0	1064.66	3750.02	2.50	0.0396	17.51	140.0	1100.27	3890.05	3.00	0.0394	17.58

**Tabela 34.** Deskriptivna statistička analiza farmakokinetičkih parametara izračunatih bez korekcije koncentracije levotiroksina u odnosu na endogeni nivo

Parametar	Test formulacija		Referentni preparat	
	± SD	CV (%)	± SD	CV (%)
PIK <sub>0-t</sub> (ngh/mL)	910.59 ± 68.31 (814.55-1064.66)	7.2	925.69 ± 80.12 (796.21-1100.27)	8.6
PIK <sub>0-∞</sub> (ngh/mL)	3861.15 ± 799.65 (2574.81-5187.27)	20.8	4103.11 ± 1091.46 (2430.05-6318.27)	26.5
C <sub>max</sub> (ng/mL)	120.77 ± 10.29 (104.00-143.00)	8.5	124.45 ± 11.82 (109.00-144.00)	9.5
t <sub>max</sub> (h)	1.96 ± 0.82 (0.67-4.00)	41.8	1.99 ± 1.18 (1.00-6.00)	59.1
k <sub>el</sub> (1/h)	0.035 ± 0.01 (0.013-0.050)	28.6	0.029 ± 0.01 (0.008-0.049)	34.5
t <sub>1/2</sub> (h)	22.29 ± 8.99 (13.76-54.11)	40.3	27.97 ± 14.66 (14.06-81.91)	52.4

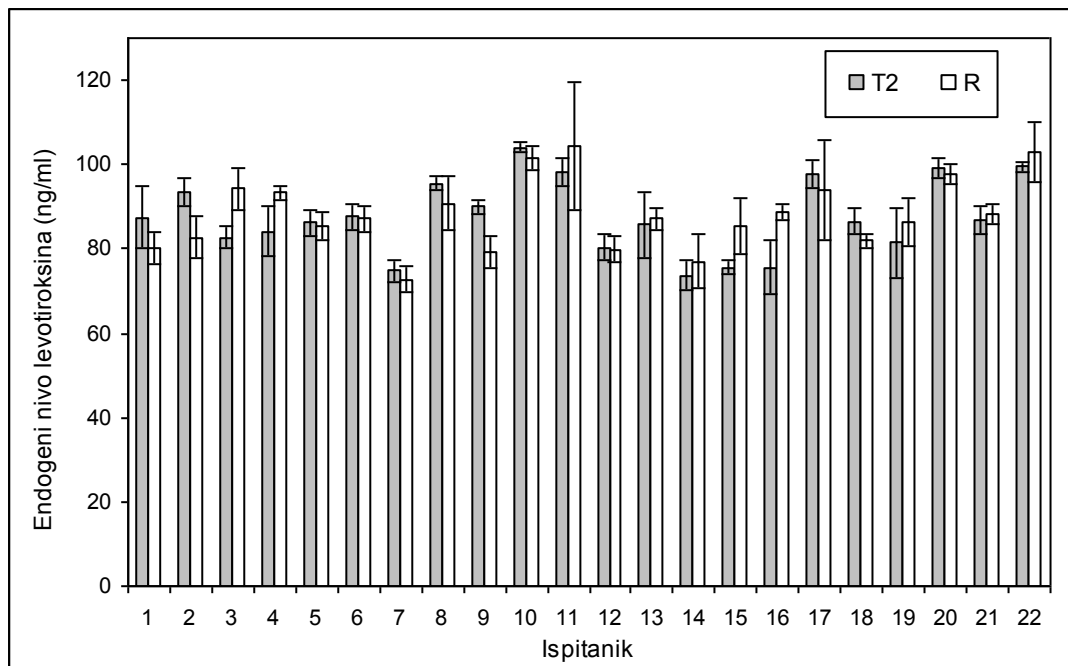
Devet sati nakon primene ispitivanih preparata uočen je porast koncentracije levotiroksina kod sedamnaest ispitanika, što se može objasniti aktivacijom kompleksne povratne sprege hipotalomusno-hipofizno-tireoidne osovine koja reguliše sekreciju endogenog levotiroksina. Aktivacijom ove sprege usled naglog porasta koncentracije levotiroksina, nakon primene egzogenog levotiroksina, došlo je do supresije sekrecije endogenog hormona. Inhibicija sekrecije je postojala sve dok nije došlo do značajnijeg pada koncentracije levotiroksina. Tada je kod većine ispitanika uočen nagli porast i dalje fluktuacije u koncentracijama levotiroksina. Zbog toga su u statističkoj analizi razmatrane koncentracije do 9 sati, jer se očekuje da u toku tog vremenskog perioda izmerene koncentracije levotiroksina potiču od primenjenih preparata.

Srednje vrednosti koncentracija levotiroksina izmerene u uzorcima uzetim 30 minuta, 15 minuta i neposredno pre primene leka, su uzete u obzir kao početni endogeni nivoi levotiroksina (slika 18). Relativno visok endogeni nivo levotiroksina koji je uočen kod ispitanika bi mogao da maskira razlike između ispitivanih preparata. Iz tog razloga, izvršena je korekcija izmerene ukupne koncentracije levotiroksina kod svakog

ispitanika u odnosu na njegov endogeni nivo i procena bioekvivalencije urađena sa nekorigovanim i korigovanim koncentracijama levotiroksina. Razlike ukupne izmerene koncentracije levotiroksina nakon primene ispitivanih preparata i endogene koncentracije za svakog ispitanika posebno prikazane su u tabelama 35 i 36. Individualni profili koncentracija levotiroksina nakon primene ispitivanih preparata prikazani su na slici 19. Profili srednjih vrednosti korigovanih koncentracija levotiroksina u funkciji vremena prikazani su na slikama 20 i 21.

Korigovane koncentracije nakon 20 minuta od trenutka primene leka su bile 4.25 ng/ml (test formulacija) i 1.72 ng/ml (referentni preparat). Devet sati nakon primene, korigovane koncentracije su iznosile 5.47 ng/ml u slučaju test formulacije i 6.62 ng/ml u slučaju referentnog preparata. Dvanaest sati nakon primene, korigovane koncentracije su bile 9.18 ng/ml u slučaju test formulacije i 6.72 ng/ml u slučaju referentnog preparata i ostale su više u odnosu na vrednosti koncentracija nakon devet sati sve do kraja perioda praćenja. Korigovana srednja maksimalna koncentracija levotiroksina iznosila je  $33.22 \pm 9.17$  ng/ml za test formulaciju i  $36.23 \pm 9.65$  ng/ml za referentni preparat. Farmakokinetički parametri za svakog ispitanika pojedinačno, izračunati nakon korekcije koncentracije levotiroksina u odnosu na endogeni nivo, prikazani su u tabeli 37, dok su srednje vrednosti farmakokinetičkih parametara i deskriptivna statistička analiza prikazani u tabeli 38.





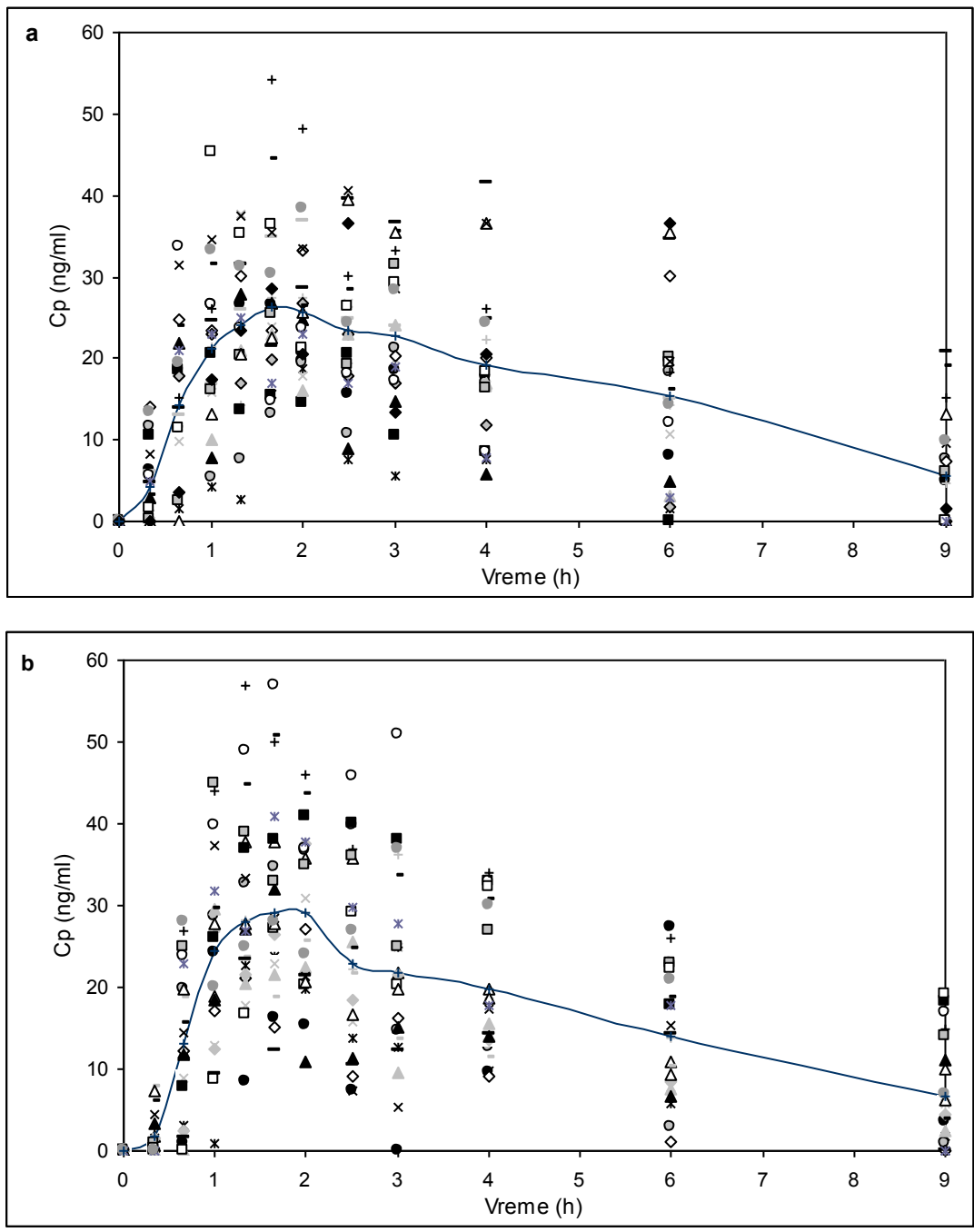
**Slika 18.** Endogeni nivo levotiroksina kod ispitanika pre primene test formulacije (sive kolone) i pre primene referentnog preparata (bele kolone). Podaci predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SD (n=3)

**Tabela 35.** Koncentracije levotiroksina (ng/ml) posle oralne primene test formulacije, korigovane u odnosu na endogeni nivo

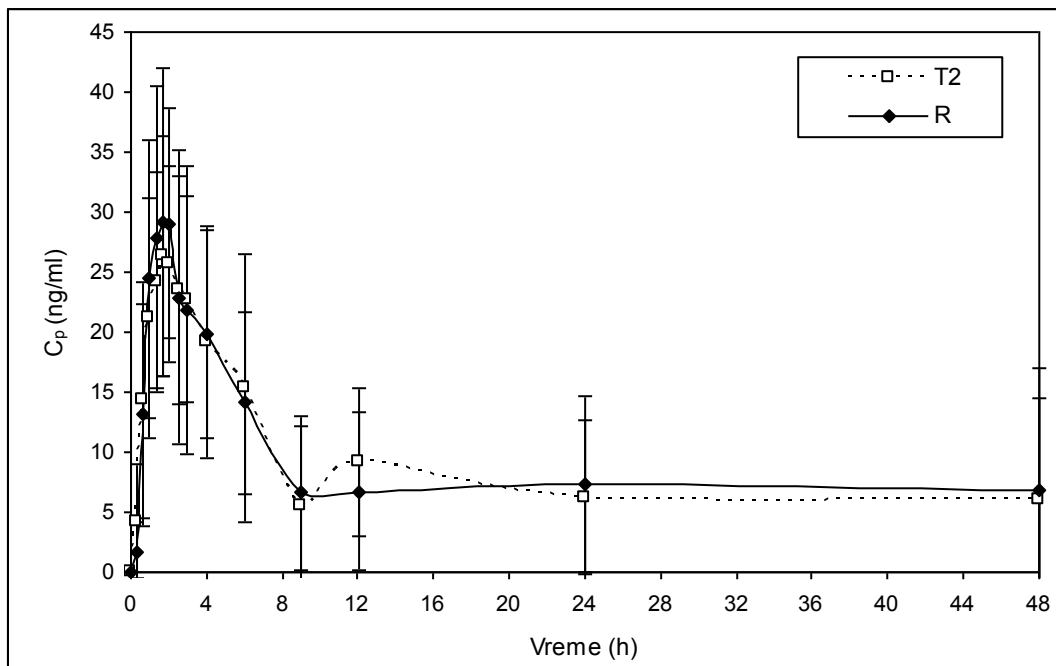
Dobrovoljac	Vreme (h)														
	0	0.33	0.66	1	1.33	1.66	2	2.5	3	4	6	9	12	24	48
1	0.00	6.23	18.53	26.53	26.53	26.53	19.53	15.53	18.53	17.53	8.13	4.93	5.23	0.00	2.83
2	0.00	0.00	1.63	4.23	2.63	15.63	18.63	7.63	5.63	7.63	1.53	0.93	17.63	3.03	0.00
4	0.00	11.50	11.40	5.30	7.50	13.10	19.30	10.60	21.30	16.90	18.30	7.60	6.70	9.60	5.80
5	0.00	6.07	12.97	16.77	25.77	34.77	36.77	24.77	23.77	15.77	14.87	0.00	14.27	17.77	13.37
7	0.00	0.90	9.80	15.80	37.80	23.80	17.80	26.80	19.80	16.80	10.70	0.00	11.40	0.00	6.10
8	0.00	0.00	3.37	21.37	14.37	27.37	27.37	19.37	17.37	22.37	14.37	4.67	4.37	0.00	0.00
9	0.00	14.00	24.80	23.50	30.20	23.40	33.20	22.90	20.20	20.10	30.20	7.30	5.30	0.00	0.00
10	0.00	10.50	18.50	20.50	13.50	15.50	14.50	20.50	10.50	8.50	0.00	0.00	8.50	0.00	0.00
11	0.00	0.00	0.00	9.93	21.03	23.03	16.03	23.03	24.03	17.03	3.13	0.00	1.43	0.00	0.00
12	0.00	0.00	17.87	22.87	16.87	19.87	26.87	17.87	16.87	11.87	1.87	0.00	14.87	3.87	10.87
13	0.00	2.83	21.83	7.83	27.83	26.83	24.83	8.83	14.83	5.83	4.83	0.00	0.00	4.83	1.83
14	0.00	5.57	33.57	26.57	23.57	14.67	23.57	18.17	17.27	8.37	11.97	0.00	2.17	9.77	0.00
15	0.00	0.00	15.20	26.20	27.20	54.20	48.20	30.20	33.20	26.20	18.20	15.20	15.20	0.00	3.50
16	0.00	3.17	23.97	31.37	31.37	44.37	26.37	28.37	35.37	24.67	15.97	18.87	5.37	12.77	9.37
17	0.00	4.60	13.90	24.50	31.50	21.40	28.50	39.50	36.50	41.50	34.50	20.80	19.20	8.90	0.00
18	0.00	0.17	2.37	15.97	20.37	25.37	21.07	19.27	31.37	16.37	19.97	5.97	5.57	7.27	0.00
19	0.00	1.50	11.30	45.30	35.30	36.30	21.30	26.30	29.30	18.30	19.30	0.00	7.30	5.30	0.00
20	0.00	0.00	0.00	13.07	20.57	22.57	25.57	39.57	35.57	36.57	35.57	13.17	15.57	15.57	32.57
21	0.00	8.23	31.53	34.53	37.53	35.53	33.53	40.53	28.53	36.53	19.53	9.63	16.23	9.03	14.53
22	0.00	4.87	20.87	22.87	24.87	16.87	22.87	16.87	18.87	7.87	2.87	0.00	0.00	0.00	0.00
23	0.00	13.30	19.30	33.30	31.30	30.30	38.30	24.30	28.30	24.30	14.30	9.80	16.30	7.10	20.30
24	0.00	0.00	3.47	17.47	23.47	28.47	20.47	36.47	13.47	20.47	36.47	1.47	9.47	21.47	11.47
$\bar{x}_{sr}$	0.00	4.25	14.37	21.17	24.14	26.36	25.66	23.52	22.75	19.16	15.30	5.47	9.18	6.19	6.02
SD	0.00	4.68	9.84	10.04	9.14	10.04	8.19	9.53	8.57	9.72	11.18	6.62	6.10	6.42	8.44

**Tabela 36.** Koncentracije levotiroksina (ng/ml) posle oralne primene referentnog preparata, korigovane u odnosu na endogeni nivo

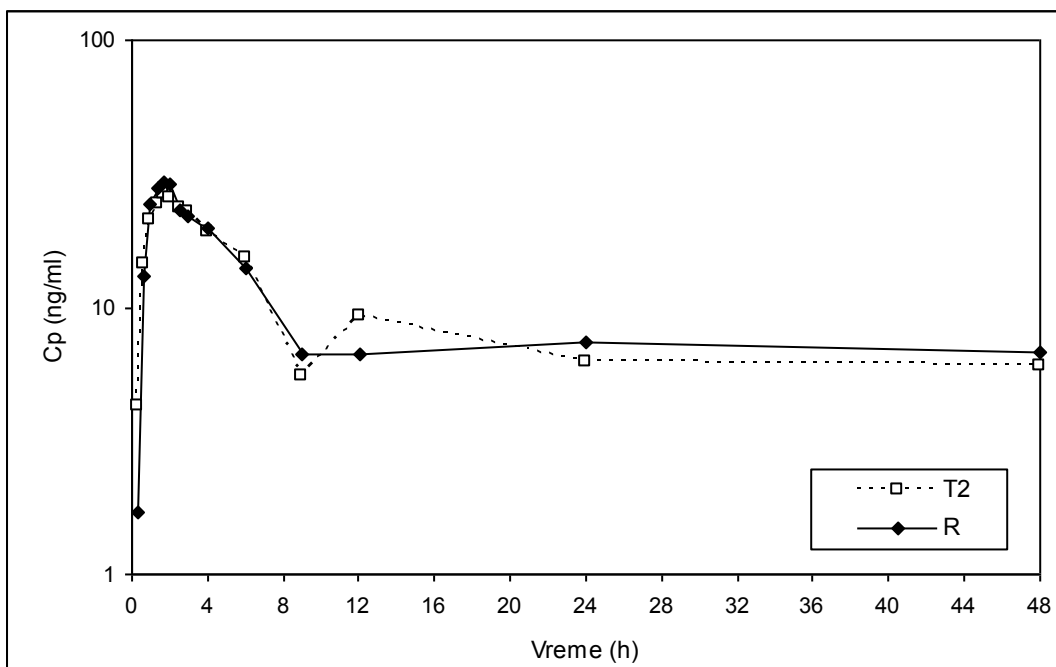
Dobrovoljac	Vreme (h)														
	0	0.33	0.66	1	1.33	1.66	2	2.5	3	4	6	9	12	24	48
1	0.00	1.80	12.10	19.00	37.80	37.80	35.80	35.80	21.80	19.80	10.90	9.90	0.00	21.80	14.70
2	0.00	0.00	0.97	24.27	8.47	16.27	15.37	7.27	0.00	9.57	27.27	3.47	0.00	9.27	6.07
4	0.00	1.64	3.14	0.94	22.74	23.74	19.74	13.74	12.74	9.73	5.74	1.74	4.93	8.73	0.00
5	0.00	0.00	19.67	28.67	32.67	34.67	36.67	39.67	14.67	12.67	2.97	0.87	0.00	6.67	6.57
7	0.00	7.67	18.57	26.57	23.57	18.57	25.57	21.57	13.57	11.27	10.17	0.00	0.00	0.00	2.37
8	0.00	0.00	8.97	12.87	17.87	22.87	30.87	15.87	24.87	13.87	7.77	5.77	4.47	0.00	10.27
9	0.00	0.00	12.30	29.20	28.20	27.20	29.20	22.20	36.20	18.70	13.70	5.70	6.90	0.00	0.00
10	0.00	0.00	12.20	17.20	21.20	15.20	27.20	9.20	16.20	9.10	1.10	0.00	0.00	6.00	9.20
11	0.00	0.00	7.83	25.93	36.93	37.93	40.93	39.93	37.93	32.93	17.73	18.13	20.93	0.00	0.00
12	0.00	0.00	0.00	29.47	20.47	21.47	22.47	25.47	9.47	15.47	7.47	2.47	0.47	7.47	0.00
13	0.00	1.47	2.47	12.47	21.47	26.47	37.47	18.47	21.47	13.47	8.47	4.47	1.47	0.00	0.00
14	0.00	3.37	11.87	18.37	27.07	32.07	10.97	11.27	15.07	14.07	6.57	11.17	17.77	13.37	14.17
15	0.00	0.00	23.87	39.87	48.87	56.87	36.87	45.87	50.87	32.87	22.87	16.87	12.07	12.87	6.47
16	0.00	2.87	26.97	43.97	56.97	49.97	45.97	36.97	24.97	33.97	25.97	14.87	12.27	18.37	10.77
17	0.00	5.97	15.57	29.57	44.57	50.57	43.57	24.57	33.57	30.57	18.57	3.87	0.07	7.37	0.00
18	0.00	0.00	1.63	9.23	23.33	12.33	21.33	10.43	12.33	14.33	14.33	0.03	0.00	0.00	0.00
19	0.00	0.87	24.97	44.97	38.97	32.97	34.97	35.97	24.97	26.97	22.97	13.97	10.97	0.00	6.97
20	0.00	0.23	0.00	8.63	16.63	27.13	20.13	29.13	20.13	32.13	22.13	19.13	16.93	10.43	10.43
21	0.00	7.43	19.73	27.73	27.73	27.73	20.73	16.73	19.73	18.73	9.33	6.13	6.43	3.73	0.00
22	0.00	4.40	14.40	37.40	33.40	28.40	21.40	7.40	5.40	17.40	15.40	0.00	11.40	0.00	0.00
23	0.00	0.10	22.80	31.80	26.80	40.80	37.80	29.80	27.80	17.80	17.80	0.00	5.60	13.80	5.40
24	0.00	0.00	28.00	20.00	25.00	28.00	24.00	27.00	37.00	30.00	21.00	7.00	10.00	6.00	4.00
x <sub>sr</sub>	0.00	1.72	13.09	24.46	27.91	29.16	29.05	22.90	21.85	19.79	14.10	6.62	6.72	7.39	6.76
SD	0.00	2.51	9.19	11.59	12.52	12.90	9.61	12.28	11.99	8.68	7.60	6.42	6.60	7.32	10.24



**Slika 19.** Individualni profili koncentracije levotiroksina u plazmi u funkciji vremena, korigovani u odnosu na endogeni nivo levotiroksina: nakon primene test formulacije (a) i nakon primene referentnog preparata (b)



**Slika 20.** Profili srednjih vrednosti koncentracija ( $\pm$  SD) levotiroksina nakon primene ispitivanih preparata (korigovani u odnosu na endogeni nivo)



**Slika 21.** Profili srednjih vrednosti koncentracija levotiroksina nakon primene ispitivanih preparata (korigovani u odnosu na endogeni nivo)-logaritamska skala

**Tabela 37.** Farmakokinetički parametri izračunati sa korekcijom koncentracije levotiroksina u odnosu na endogeni nivo

Dobrovoljac	T2						R					
	C <sub>max</sub>	PIK <sub>0-t</sub>	PIK <sub>0-∞</sub>	t <sub>max</sub>	k <sub>el</sub>	t <sub>1/2</sub>	C <sub>max</sub>	PIK <sub>0-t</sub>	PIK <sub>0-∞</sub>	t <sub>max</sub>	k <sub>el</sub>	t <sub>1/2</sub>
1	26.53	118.67	137.32	1.00	0.2466	2.81	37.80	157.24	220.71	1.33	0.2009	3.45
2	18.63	40.59	109.90	2.00	0.3536	1.96	27.27	114.53	135.62	6.00	0.2235	3.10
3	21.30	128.13	182.14	3.00	0.1589	4.36	23.74	73.64	79.61	1.67	0.3179	2.18
4	36.77	116.30	218.18	2.00	0.1383	5.01	39.67	112.56	114.20	2.50	0.4986	1.39
5	37.80	100.95	169.89	1.33	0.2423	2.86	26.57	90.43	201.60	1.00	0.1986	3.49
6	27.37	132.89	142.12	1.67	0.3179	2.18	30.87	109.31	131.08	2.00	0.1694	4.09
7	33.20	195.75	236.12	2.00	0.2235	3.10	36.20	153.68	173.44	3.00	0.2840	2.44
8	20.50	54.64	69.35	1.00	0.5331	1.30	27.20	61.86	66.14	2.00	0.6301	1.10
9	24.03	82.93	87.71	3.00	0.7001	0.99	40.93	222.72	344.15	2.00	0.1310	5.29
10	26.87	78.42	81.70	2.00	0.6663	1.04	29.47	98.68	105.42	1.00	0.3667	1.89
11	27.83	68.58	81.41	1.33	0.3332	2.08	37.47	110.60	127.61	2.00	0.2502	2.77
12	33.57	106.56	168.32	0.67	0.1308	5.30	32.07	106.75	244.20	1.67	0.1034	6.70
13	54.20	213.45	319.89	1.67	0.1276	5.43	56.87	264.89	355.31	1.67	0.1310	5.29
14	44.37	226.78	366.00	1.67	0.0979	7.08	56.97	254.96	345.54	1.33	0.1669	4.15
15	41.50	270.74	485.81	4.00	0.1042	6.65	50.57	202.59	214.98	1.67	0.3667	1.89
16	31.37	146.87	179.02	3.00	0.2172	3.19	23.33	96.25	96.34	1.33	0.7295	0.95
17	45.30	134.09	289.75	1.00	0.1155	6.00	44.97	217.86	324.75	1.00	0.1354	5.12
18	39.57	239.46	307.40	2.50	0.2146	3.23	32.13	187.88	372.22	4.00	0.0993	6.98
19	40.53	222.94	258.51	2.50	0.2645	2.62	27.73	129.88	157.05	1.00	0.2087	3.32
20	24.87	76.99	81.45	1.33	0.6079	1.14	37.40	97.58	164.06	1.00	0.2696	2.57
21	38.30	178.85	230.00	2.00	0.1819	3.81	40.80	136.96	243.97	1.67	0.2038	3.39
22	36.47	185.32	193.21	2.50	0.2466	1.85	37.00	193.04	220.75	3.00	0.2761	2.51

**Tabela 38.** Deskriptivna statistička analiza farmakokinetičkih parametara izračunatih sa korekcijom koncentracije levotiroksina u odnosu na endogeni nivo

Parametar	Razvojna formulacija		Referentni preparat	
	± SD	CV (%)	±SD	CV (%)
PIK <sub>0-t</sub> (ngh/mL)	141.81 ± 65.69 (40.59-270.74)	46.3	145.17 ± 58.93 (61.86-264.89)	40.6
PIK <sub>0-∞</sub> (ngh/mL)	199.78 ± 106.69 (69.35-485.81)	53.4	201.76 ± 96.03 (66.14-372.22)	47.6
C <sub>max</sub> (ng/mL)	33.22 ± 9.17 (18.63-54.20)	27.6	36.23 ± 9.65 (23.33-56.97)	26.6
t <sub>max</sub> (h)	1.96 ± 0.82 (0.67-4.00)	41.8	1.99 ± 1.18 (1.00-6.00)	59.3
k <sub>el</sub> (1/h)	0.29 ± 0.18 (0.10-0.70)	58.4	0.27 ± 0.16 (0.10-0.73)	59.2
t <sub>1/2</sub> (h)	3.13 ± 1.58 (0.98-6.73)	50.5	3.37 ± 1.68 (0.95-6.98)	49.8

U tabelama 39 i 40 prikazani su 90% CI izračunati na osnovu vrednosti koncentracija levotiroksina bez korekcije i sa korekcijom u odnosu na endogeni nivo hormona, zajedno sa rezultatima ANOVA testa.

**Tabela 39.** Rezultati statističke analize (bez korekcije u odnosu na endogeni nivo)

	C <sub>max</sub>	PIK <sub>0-t</sub>	PIK <sub>0-∞</sub>
90% CI	0.9472-0.9979	0.9683-1.0070	0.8844-1.0046
p vrednost (ANOVA)			
sekvenca	0.7921	0.3351	0.9283
period	0.4825	0.4303	0.0810
formulacija	0.0900	0.3005	0.1411
ispitanici (sekvenca)	0.0001	0.0001	0.0001

**Tabela 40.** Rezultati statističke analize (sa korekcijom u odnosu na endogeni nivo)

	$C_{max}$	$PIK_{0-t}$	$PIK_{0-\infty}$
90% CI	0.8470-1.0011	0.8054-1.0912	0.8004-1.1836
p vrednost (ANOVA)			
sekvenca	0.7574	0.9222	0.8375
period	0.0532	0.6176	0.6270
formulacija	0.1187	0.5577	0.5674
ispitanici (sekvenca)	0.0005	0.0015	0.0068

ANOVA je pokazala da nema statistički značajne razlike između ispitivanih preparata u pogledu uticaja formulacije, perioda i sekvence na vrednosti farmakokinetičkih parametara dobijenih bez korekcije, kao i sa korekcijom u odnosu na endogeni nivo levotiroksina ( $p > 0.05$ ). Međutim, u oba slučaja su uočene značajne interindividualne varijacije.

90% CI, izračunati na osnovu logaritamski transformisanih farmakokinetičkih parametara, odgovarali su standardnim kriterijumima za studije bioekvivalencije (0.80-1.25), ali su se u slučaju  $PIK_{0-t}$  i  $PIK_{0-\infty}$ , izračunatih na osnovu korekcije koncentracije levotiroksina u odnosu na endogeni nivo, nalazili na donjoj granici prihvatljivosti. Da bi se ispitaio uticaj primenjene metodologije za procenu bioekvivalencije na dobijene vrednosti 90% CI, izvršen je *flip-flop*, odnosno test formulacija je analizirana kao referentni preparat i obrnuto, referentni preparat kao test formulacija. Dobijene vrednosti 90% CI su takođe bile u opsegu 0.80-1.25, ali se nisu nalazile na samim granicama prihvatljivosti ni kod jednog analiziranog farmakokinetičkog parametra (tabela 41).



**Tabela 41.** Rezultati statističke analize (*flip-flop* analiza)

	$C_{\max}$	$PIK_{0-t}$	$PIK_{0-\infty}$
90% CI	0.9954-1.1734	0.8546-1.1493	0.8989-1.2240
p vrednost (ANOVA)			
sekvenca	0.7948	0.6156	0.8945
period	0.0603	0.8205	0.9465
formulacija	0.1345	0.9212	0.7223
ispitanici (sekvenca)	0.0003	0.0001	0.0008

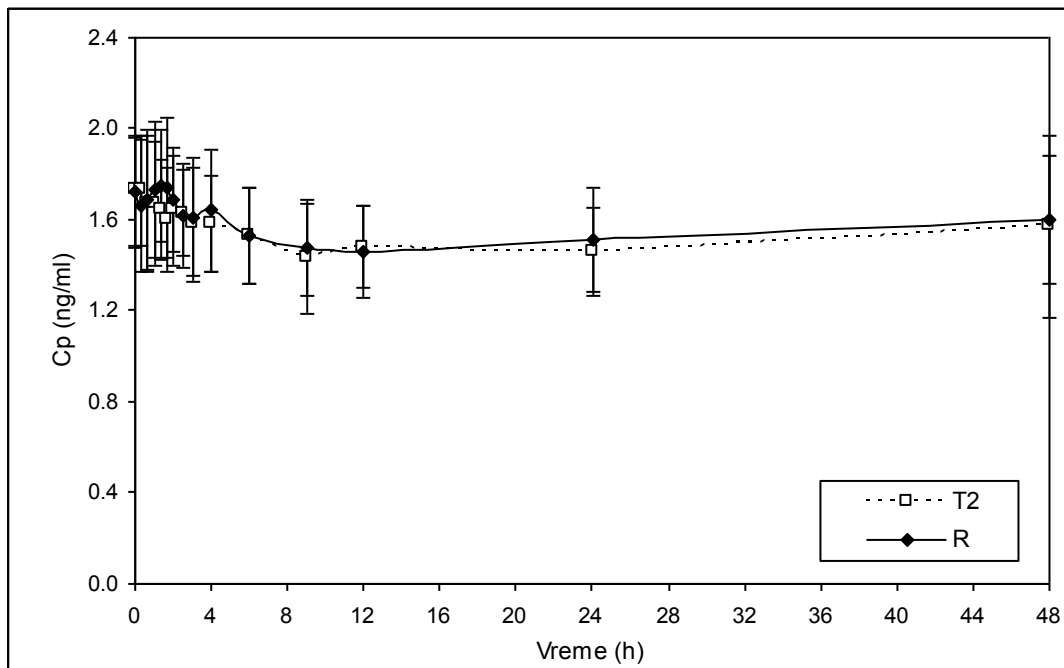
Koncentracije trijodotironina u plazmi zdravih ispitanika u funkciji vremena nakon pojedinačne primene ispitivanih preparata, prikazane su tabelarno za svakog ispitanika pojedinačno, kao i odgovarajuće srednje vrednosti (tabele 42 i 43), dok su profili srednjih vrednosti koncentracija u funkciji vremena prikazani na slici 22. Upoređivanje koncentracija trijodotironina za svaki vremenski interval pojedinačno putem ANOVA testa pokazalo je da nema značajnih razlika ni između koncentracija trijodotironina nakon primene ispitivanih preparata ( $p > 0.05$ ).

**Tabela 42.** Koncentracije trijodotironina (ng/ml) posle oralne primene test formulacije

Dobrovoljac	Vreme (h)														
	0	0.33	0.66	1	1.33	1.66	2	2.5	3	4	6	9	12	24	48
1	1.54	1.59	1.47	1.50	1.59	1.40	1.48	1.50	1.42	1.48	1.46	1.25	1.34	1.31	1.18
2	1.28	1.27	1.12	1.17	1.22	1.29	1.26	1.25	1.27	1.33	1.35	1.34	1.20	1.22	1.19
4	1.74	1.80	1.93	1.63	1.72	1.68	1.94	1.83	1.71	1.56	1.69	1.60	1.52	1.68	1.66
5	1.82	1.79	1.43	1.65	1.57	1.74	2.06	1.74	1.60	1.62	1.83	1.30	1.35	1.57	1.69
7	1.91	1.83	1.60	1.66	2.02	1.77	1.72	1.69	1.62	1.69	1.54	1.47	1.59	1.53	1.79
8	1.80	1.71	1.57	1.66	1.79	1.68	1.66	1.57	1.44	1.65	1.52	1.48	1.59	1.33	1.23
9	1.71	1.80	1.59	1.34	1.40	1.36	1.36	1.49	1.39	1.32	1.29	1.06	1.39	1.23	1.06
10	1.58	1.65	1.76	1.63	1.60	1.39	1.44	1.39	1.51	1.46	1.32	1.30	1.62	1.41	1.76
11	1.48	1.76	1.36	1.50	1.40	1.31	1.48	1.54	1.56	1.32	1.22	1.06	1.23	1.48	1.59
12	1.46	1.68	1.57	1.71	1.62	1.36	1.44	1.56	1.35	1.31	1.39	1.54	1.51	1.38	1.17
13	2.17	2.09	2.56	2.25	1.96	2.13	2.05	2.06	2.05	1.76	1.40	1.79	1.71	1.66	2.20
14	1.84	2.09	2.09	1.89	1.71	1.71	1.60	1.60	1.54	1.63	1.45	1.29	1.52	1.40	1.63
15	1.74	1.72	1.57	1.97	1.91	1.66	1.76	1.54	1.89	1.59	1.77	1.35	1.56	1.49	1.42
16	1.74	1.66	1.63	1.37	1.68	1.60	1.56	1.57	1.74	1.42	1.44	1.35	1.36	1.42	1.53
17	1.91	1.77	1.63	1.60	1.63	1.65	1.63	1.65	1.56	1.82	1.88	1.77	1.40	1.12	1.14
18	2.14	2.19	1.99	1.80	1.80	1.94	1.99	2.03	2.03	1.60	1.69	1.76	1.77	1.69	1.76
19	2.20	2.14	1.99	2.36	2.05	2.02	2.02	1.86	2.08	2.08	2.02	1.77	1.82	1.80	1.89
20	1.62	1.30	1.50	1.56	1.36	1.34	1.39	1.66	1.33	2.03	1.57	1.86	1.57	1.76	2.82
21	1.42	1.54	1.80	1.72	1.46	1.57	1.53	1.63	1.26	1.48	1.42	1.28	1.23	1.46	1.65
22	1.85	1.74	1.69	1.54	1.59	1.59	1.63	1.54	1.53	1.48	1.41	1.29	1.22	1.18	1.18
23	1.51	1.52	1.38	1.62	1.63	1.51	1.59	1.49	1.36	1.65	1.35	1.25	1.66	1.49	1.52
24	1.60	1.45	1.59	1.52	1.41	1.46	1.39	1.59	1.52	1.46	1.56	1.30	1.34	1.52	1.47
$\bar{x}_{sr}$	1.73	1.73	1.67	1.67	1.64	1.60	1.64	1.63	1.58	1.58	1.53	1.43	1.48	1.46	1.57
SD	0.24	0.24	0.30	0.27	0.22	0.23	0.24	0.19	0.25	0.21	0.21	0.24	0.18	0.19	0.40

**Tabela 43.** Koncentracije trijodotironina (ng/ml) posle oralne primene referentnog preparata

Dobrovoljac	Vreme (h)														
	0	0.33	0.66	1	1.33	1.66	2	2.5	3	4	6	9	12	24	48
1	1.68	1.60	1.53	1.40	1.76	1.54	1.79	1.36	1.44	1.29	1.17	1.27	1.00	1.53	1.45
2	1.28	1.06	1.25	1.62	1.13	1.28	1.56	1.15	1.10	1.16	1.36	1.30	1.16	1.33	1.39
4	1.68	1.54	1.77	1.72	1.91	1.69	1.62	1.50	1.46	1.63	1.43	1.36	1.62	1.77	1.72
5	1.80	1.77	1.60	1.83	1.88	1.94	1.69	1.93	1.74	1.71	1.54	1.35	1.59	1.48	1.60
7	1.87	1.62	1.66	1.57	1.86	1.86	1.76	1.60	1.44	1.39	1.40	1.18	1.25	1.33	1.57
8	1.84	1.96	1.74	1.63	2.03	1.54	1.83	1.72	1.77	1.77	1.59	1.69	1.50	1.53	1.43
9	1.52	1.62	1.37	1.41	1.43	1.66	1.48	1.38	1.35	1.52	1.47	1.36	1.29	1.19	1.24
10	1.50	1.35	1.44	1.52	1.76	1.21	1.57	1.32	1.44	1.54	1.32	1.29	1.42	1.63	1.93
11	1.50	1.35	1.40	1.46	1.56	1.85	1.48	1.56	1.52	1.48	1.37	1.59	1.47	1.09	1.19
12	1.44	1.42	1.14	1.49	1.46	1.53	1.40	1.49	1.41	1.30	1.46	1.28	1.32	1.27	1.42
13	2.03	1.93	2.19	2.49	2.11	2.20	2.19	1.86	1.91	2.16	2.13	1.91	1.69	1.42	1.62
14	1.88	1.60	1.69	1.79	1.71	1.96	1.48	1.59	1.28	1.82	1.39	1.56	1.44	1.65	1.80
15	1.68	1.56	1.69	2.02	1.96	2.16	1.85	1.74	1.69	1.80	1.45	1.51	1.40	1.40	1.69
16	1.84	1.88	1.83	1.62	1.80	1.79	1.68	1.77	1.89	1.96	1.57	1.59	1.68	1.71	1.60
17	1.91	1.86	1.81	1.89	1.83	2.20	2.19	1.83	1.89	1.68	1.60	1.38	1.43	1.48	1.53
18	1.86	2.14	2.16	1.97	1.83	1.86	1.83	1.79	2.02	1.85	1.82	1.74	1.63	1.32	1.62
19	2.28	2.26	2.49	2.13	2.33	2.28	1.96	2.17	2.16	2.28	1.91	1.86	1.77	1.74	1.65
20	1.39	1.46	1.56	1.57	1.54	1.41	1.43	1.52	1.53	1.50	1.57	1.34	1.28	1.52	2.53
21	1.47	1.59	1.47	1.50	1.59	1.40	1.48	1.50	1.42	1.48	1.46	1.25	1.34	1.22	1.27
22	1.98	2.08	1.83	2.31	1.79	1.80	1.74	1.72	1.83	1.63	1.57	1.72	1.65	1.68	1.66
23	1.66	1.38	1.74	1.62	1.59	1.53	1.71	1.63	1.62	1.60	1.57	1.65	1.79	1.93	1.63
24	1.73	1.57	1.72	1.45	1.72	1.48	1.46	1.42	1.59	1.63	1.49	1.31	1.43	1.97	1.69
$\bar{x}_{sr}$	1.72	1.66	1.69	1.73	1.75	1.74	1.69	1.62	1.61	1.64	1.53	1.48	1.46	1.51	1.60
SD	0.24	0.29	0.31	0.30	0.25	0.31	0.23	0.23	0.26	0.27	0.21	0.21	0.20	0.23	0.28



**Slika 22.** Profili srednjih vrednosti koncentracija ( $\pm$  SD) trijodotironina nakon primene ispitivanih preparata

Evidentno je da su vrednosti 90% CI izračunate metodom korekcije bile bliže граниčnim vrednostima kriterijuma za utvrđivanje bioekvivalencije. Levotiroksin je normalno prisutan u krvi u koncentracijama od 50 do 120 ng/ml i pitanje korigovanja izmerenih vrednosti koncentracija levotiroksina u odnosu na endogeni nivo je već dugo godina predmet intenzivnih diskusija stručne javnosti [30-34]. Rezultati pojedinih studija bioekvivalencije ukazuju da korišćenje nekorigovanih vrednosti  $C_{max}$  i PIK može imati za posledicu da se dva preparata proglase bioekvivalentnim, pri čemu se oni zapravo razlikuju za 35% [30]. Endogeni nivoi levotiroksina kod ispitanika u našoj studiji su bili varijabilni i viši od endogenih nivoa prikazanih u studiji bioekvivalencije Di Girolama i saradnika [181]. Što je endogeni nivo bliži ukupnoj koncentraciji levotiroksina, to je veći njegov uticaj na procenu bioekvivalencije. Relativno visok endogeni nivo može da maskira razliku između ispitivanih preparata, tako da bi korigovanje izmerenih koncentracija u odnosu na endogeni nivo, kao i korišćenje visokih doza u studijama bioekvivalencije trebalo da doprinese tačnijoj proceni bioekvivalencije. Korekcija koncentracije levotiroksina u ovoj studiji bioekvivalencije je izvršena u skladu sa preporukama važećih smernica, oduzimanjem srednje vrednosti koncentracija tri uzorka krvi uzetih pre davanja leka od svakog uzorka krvi uzetog

nakon davanja leka [35]. Alternativno, studije bioekvivalencije bi mogle da se izvode na atireotičnim ispitanicima, čime bi se izbegli interferirajući uticaji endogenog levotiroksina [182]. Međutim, ovaj pristup je veoma komplikovan i nije često primenjivan do sada. Uticaj endogenog nivoa levotiroksina na vrednosti farmakokinetičkih parametara bi eventualno mogao da se evaluiira populacionim farmakokinetičkim pristupom, da bi se izabrali ispitanici sa nižim endogenim nivoima hormona, ali koji su još uvek u fiziološkim granicama. Ovo bi takođe imalo za rezultat smanjenje broja neželjenih efekata koji se mogu javiti pri primeni visoke doze levotiroksina na eutireoidnim ispitanicima. Imajući u vodu da su endogeni nivoi levotiroksina kod ispitanika u našoj studiji bili varijabilni i viši od endogenih nivoa prikazanih u studijama bioekvivalencije koje se mogu naći u literaturi [181], moglo se očekivati da će imati značajan uticaj na procenu bioekvivalencije. Ovo se jasno vidi na osnovu rezultata za 90% CI (tabele 39 i 40). Iako su u oba slučaja zadovoljeni kriterijumi za uspostavljanje bioekvivalencije, vrednosti 90% CI izračunate na osnovu rezultata dobijenih metodom korekcije su bile bliže graničnim vrednostima, a u slučaju  $PIK_{0-t}$  i  $PIK_{0-\infty}$  nalazile su se na donjoj granici prihvatljivosti. Kada je izvršena *flip-flop* analiza (test formulacija analizirana kao referentni preparat i obrnuto), dobijene vrednosti 90% CI za korigovane farmakokinetičke parametre su u potpunosti odgovarale kriterijumima za uspostavljanje bioekvivalencije. Iako se po smernici FDA levotiroksin definiše kao lek uskog terapijskog indeksa (*narrow therapeutic index*, NTI), granice prihvatljivosti za 90% CI su iste kao i za lekove velike terapijske širine i ne postoji preporuka za njihovo sužavanje [23]. Klasifikacija levotiroksina u grupu lekova uske terapijske širine je veoma diskutabilna [30, 183]. Levotiroksin ne odgovara definiciji leka uske terapijske širine, odnosno leka kod koga je odnos najniže koncentracije pri kojoj se javlja klinička toksičnost i minimalne terapijske koncentracije jednak ili manji od 2 [184]. Takođe, korišćenje visoke doze leka u skladu sa preporukama za izvođenje studije bioekvivalencije tableta levotiroksina, koja se nikada klinički ne primenjuje, svakako se ne može smatrati sigurnim i prihvatljivim za lek uske terapijske širine. Sa druge strane, u kliničkoj praksi levotiroksin se smatra lekom uske terapijske širine. S obzirom da je sekrecija levotiroksina precizno regulisana fiziološkom povratnom spregom i da pokazuje veliku interindividualnu varijabilnost, supstituciona terapija često može biti problematična i dovesti pacijenta u stanje

hipertireoze ili hipotireoze. Iz tog razloga, terapija ovim lekom mora biti adekvatno dozirana i praćena da bi se postigli pozitivni efekti. Sve dok se ne razjasne ove nelogičnosti oko klasifikacije levotiroksina na osnovu njegove terapijske širine, preporuka je da se koriste standardni kriterijumi kada je u pitanju procena bioekvivalencije za tablete levotiroksina. Dalja istraživanja u oblasti dizajna studija bioekvivalencije formulacija levotiroksina su neophodna u budućnosti kako bi se vršila pouzdana procena bioekvivalencije, s obzirom na specifičnost ove lekovite supstance. Standardna metoda prosečne bioekvivalencije bi mogla da se zameni metodom skaliranja prosečne bioekvivalencije: granice prihvatljivosti za 90% CI bi mogle da se podese skaliranjem u odnosu na intraindividualnu varijabilnost određenu za referentni preparat u studiji [185, 186].

## 5.3 *IN SILICO* ISPITIVANJE

### 5.3.1 Gastrointestinalna simulacija-razvoj modela

Fizičko-hemijski, farmakokinetički i farmaceutsko-tehnološki parametri koji su korišćeni kao ulazne vrednosti za simulacije su prikazani u tabeli 44.

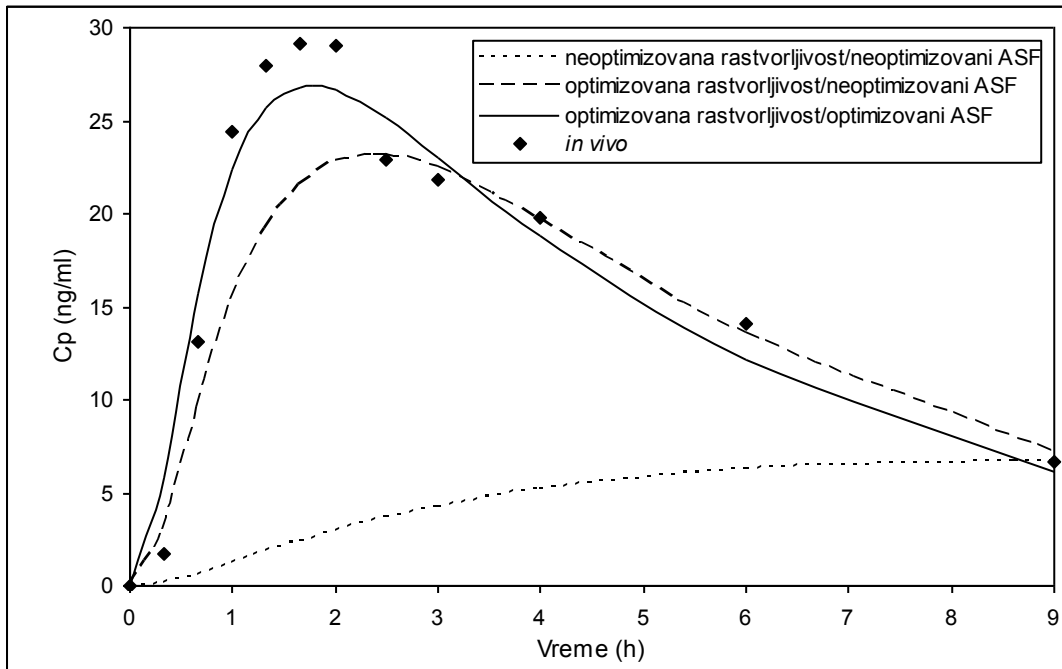
Za početne simulacije i razvoj modela resorpcije levotiroksina korišćena je eksperimentalno određena vrednost za rastvorljivost u kombinaciji sa opštim neoptimizovanim ASF vrednostima datim u okviru *GastroPlus<sup>TM</sup>* Opt logD SA/V 6.1 modela. Ove ASF vrednosti su zasnovane na log D-zavisnoj kalibraciji literaturnih podataka o permeabilnosti i procentu resorpcije niza lekovitih supstanci i koriste se kada nisu dostupni adekvatni podaci o konkretnoj lekovitoj supstanci. Iz tih razloga ove opšte vrednosti ASF faktora često moraju biti modifikovane da bi se izvršila što bolja simulacija resorpcije ispitivanog leka. Simulirani profil zavisnosti koncentracije levotiroksina u funkciji vremena i simulirani profil resorpcije na bazi eksperimentalno određene rastvorljivosti i neoptimizovanih ASF faktora prikazani su na slikama 23 i 24.

**Tabela 44.** Ulazni parametri za *GastroPlus*<sup>TM</sup> simulaciju resorpcije levotiroksina

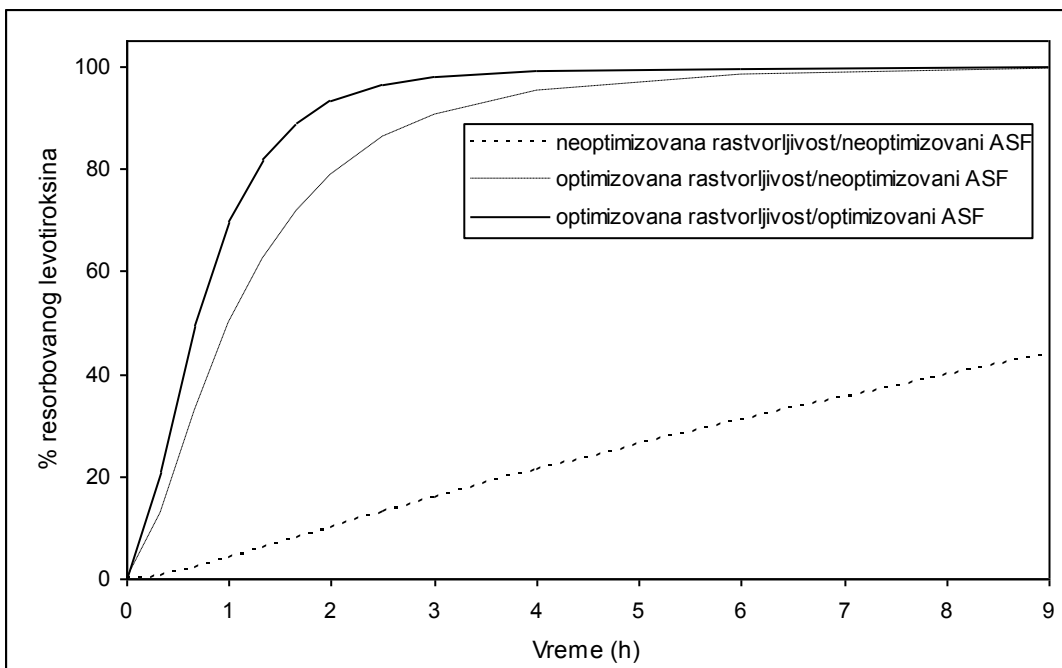
Parametar	Vrednost
molekulska masa	798.96
log P	2.39 <sup>a</sup>
pK <sub>a</sub>	2.2, 6.7, 10.1 <sup>b</sup>
efektivna permeabilnost	1.34 x 10 <sup>-4</sup> cm/s <sup>a</sup>
doza leka	0.6 mg
zapremina tečnosti uzeta sa lekom	250 ml
rastvorljivost	0.05 mg/ml <sup>c</sup>
srednje vreme precipitacije	900 s <sup>d</sup>
difuzioni koeficijent	0.4543 x 10 <sup>-5</sup> cm <sup>2</sup> /s <sup>e</sup>
gustina čestica lekovite supstance	1.2 g/ml <sup>d</sup>
radijus čestica	10 μm <sup>f</sup>
telesna masa ispitanika	70 kg
odnos koncentracije leka u krvi/plazmi	1 <sup>d</sup>
slobodna frakcija leka u plazmi, f <sub>u</sub>	1% <sup>g</sup>
klirens, Cl	3.6 l/h <sup>h</sup>
volumen distribucije, V <sub>d</sub>	0.22 l/kg <sup>h</sup>
poluvreme eliminacije, t <sub>1/2</sub>	2.97 h
vreme simulacije	9 h
farmaceutski oblik	IR tableta/CR disperzni oblik

<sup>a</sup> *in silico* procenjena vrednost (*ADME Boxes version 3.5, Pharma Algorithms, Inc*). <sup>b</sup> podatak iz literature [13]. <sup>c</sup> *GastroPlus*<sup>TM</sup> optimizovana vrednost. <sup>d</sup> *GastroPlus*<sup>TM</sup> vrednost. <sup>e</sup> *GastroPlus*<sup>TM</sup> predviđena vrednost. <sup>f</sup> *in-house* podatak. <sup>g</sup> podatak iz literature [12]. <sup>h</sup> podatak dobijen iz *in vivo* profila zavisnosti koncentracije u funkciji vremena (*WinNonlin Professional version 4.1, Pharsight, CA*).





**Slika 23.** *GastroPlus<sup>TM</sup>* simulirani i *in vivo* uočeni profil koncentracije levotiroksina u plazmi nakon oralne primene tableta levotiroksina u dozi od 600  $\mu\text{g}$



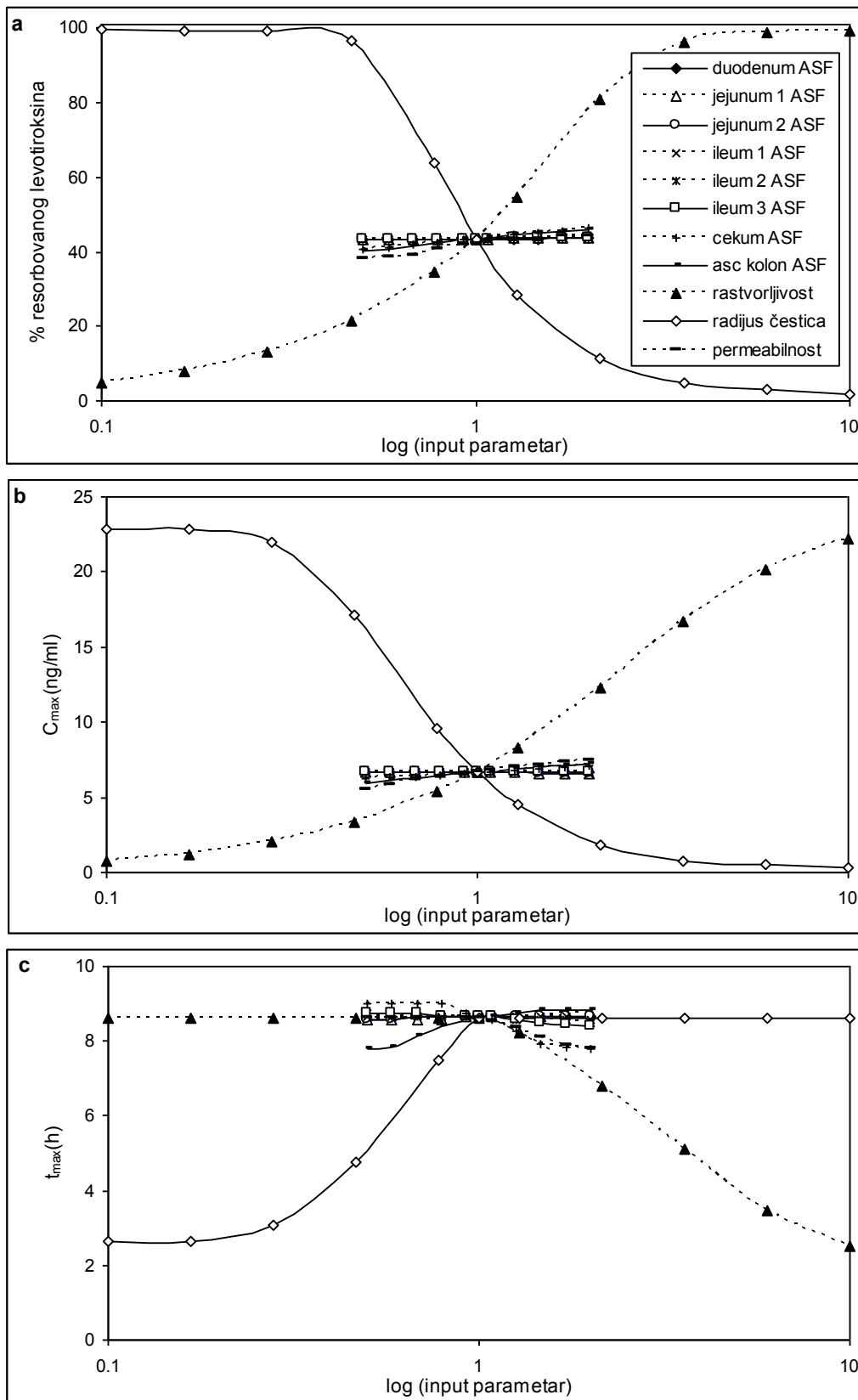
**Slika 24.** *GastroPlus<sup>TM</sup>* simulirani profili resorpcije levotiroksina

Ovako dobijeni profili su pokazali da nije moguće simulirati željeni *in vivo* profil koncentracije levotiroksina u funkciji vremena samo na osnovu dostupnih vrednosti ulaznih parametara. U cilju sagledavanja uticaja različitih ulaznih vrednosti parametara (rastvorljivost, radijus čestica, permeabilnost, vrednosti ASF) na procenat resorbovanog leka,  $C_{max}$  i  $t_{max}$ , sprovedena je preliminarna analiza osetljivosti parametara (*Parameter Sensitivity Analysis*, PSA), kako bi se zaključilo koje parametre i na koji način je potrebno optimizovati. Vrednosti rastvorljivosti i radijusa čestica varirane su u opsegu od 1/10 do 10 puta veće vrednosti u odnosu na vrednost koja je inicijalno korišćena u simulaciji, a permeabilnost i regionalni ASF faktori u opsegu od 1/2 do 2 puta. Rezultati PSA prikazani su na slici 25.

Rezultati preliminarne PSA su pokazali da stepen resorbovanog leka,  $C_{max}$  i  $t_{max}$  nisu osetljivi na varijacije regionalnih ASF vrednosti, kao i na varijacije u vrednostima za permeabilnost levotiroksina. Sa druge strane, veće vrednosti za rastvorljivost i manji radijusi čestica levotiroksina imali su pozitivan uticaj na procenat resorbovanog leka. PSA je takođe pokazala da varijacije u vrednostima za rastvorljivost i radijus čestica imaju veliki uticaj na  $C_{max}$  i  $t_{max}$ : što je veća rastvorljivost levotiroksina, a radijus čestica manji, simulirane vrednosti  $C_{max}$  i  $t_{max}$  su bliže *in vivo* uočenim vrednostima. Uzevši u obzir da je za simulaciju kao ulazna vrednost za radijus čestica korišćen podatak o veličini čestica za sirovinu levotiroksina koja je korišćena za izradu tableta (20  $\mu\text{m}$ ), može se zaključiti da je rastvorljivost levotiroksina u *in vivo* uslovima najverovatnije veća nego što je eksperimentalno određeno i da je potrebno optimizovati je. Veća rastvorljivost levotiroksina *in vivo* bi eventualno mogla da se objasni prisustvom fizioloških surfaktanata. Zato je početna vrednost za rastvorljivost optimizovana (pomoću optimizacionog modula u *GastroPlus<sup>TM</sup>* softveru), u cilju što preciznijeg predviđanja *in vivo* uočenog profila. Optimizacijom je dobijena vrednost za rastvorljivost od 0.05 mg/ml. Profil predviđen na osnovu ove optimizovane vrednosti pokazao je mnogo bolje slaganje sa *in vivo* podacima, ali se još uvek mogla uočiti značajna razlika u fazi resorpcije (slika 23). Zato je bilo neophodno modifikovati i ASF vrednosti, kako bi simulirani profil pokazao što bolje slaganje sa *in vivo* dobijenim profilom. ASF vrednosti su optimizovane podešavanjem vrednosti koeficijentata resorpcionog gradijenta C1 i C2. Ovi koeficijenti se koriste za skaliranje ASF vrednosti na nivou tankog creva. Koeficijenti C3 i C4 koji uzimaju u obzir procese na nivou

kolona nisu optimizovani, jer se najveći deo doze levotiroksina resorbuje u proksimalnom delu creva [29], tako da su za ASF vrednosti za delove ispod prostora "ileum 3" korišćene inicijalne neoptimizovane vrednosti (tabela 45). Profil koncentracije levotiroksina u plazmi u funkciji vremena simuliran na osnovu optimizovanih vrednosti za rastvorljivost i ASF je bio u najboljem slaganju sa *in vivo* uočenim profilom (slika 23).

Dobijene optimizovane vrednosti za rastvorljivost i ASF faktore su korišćene za sve dalje simulacije.



**Slika 25.** Analiza osetljivosti parametara (PSA): zavisnost stepena resorpcije levotiroksina (a),  $C_{max}$  (b) i  $t_{max}$  (c) od vrednosti izabranih ulaznih parametara. Centar X-ose predstavlja polaznu vrednost ispitivanog parametra koja je korišćena u simulacijama

**Tabela 45.** Neoptimizovane i optimizovane ASF vrednosti

Prostor	Neoptimizovan ASF	Optimizovan ASF
želudac	0	0
duodenum	2.805	5.221
jejunum 1	2.758	5.130
jejunum 2	2.732	5.076
ileum 1	2.695	5.001
ileum 2	2.632	4.869
ileum 3	2.546	4.675
cekum	1.384	1.384
ascendentni kolon	2.228	2.228

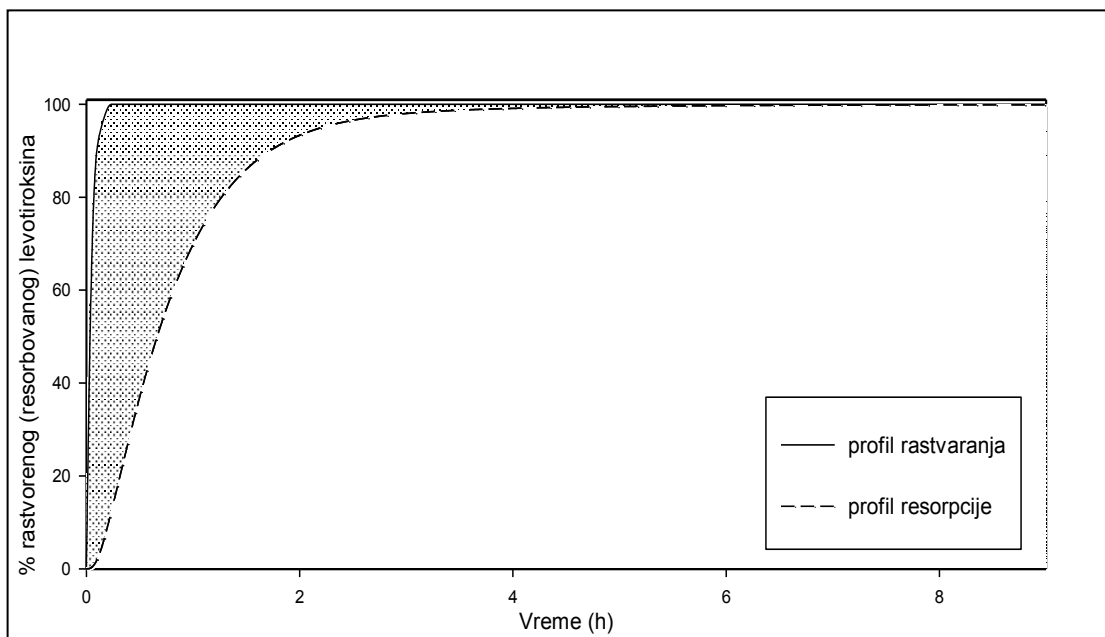
### 5.3.2 Predviđanje resorpcije levotiroksina

Na slici 23 je prikazan *GastroPlus*<sup>TM</sup> generisan profil resorpcije levotiroksina dobijen na osnovu ulaznih podataka navedenih u tabeli 44, zajedno sa profilom zavisnosti koncentracije levotiroksina u plazmi u funkciji vremena dobijenim u *in vivo* studiji. Tačnost predviđanja je procenjena na osnovu izračunavanja procenta greške predviđanja (*prediction error*, % PE), koji se definiše kao relativni odnos razlike stvarne i simulirane vrednosti parametra. Izračunate greške predviđanja za simulacije na osnovu optimizovanih ASF vrednosti su bile manje od 10% za sve farmakokinetičke parametre, ukazujući da je ovaj model dao dobro predviđanje resorpcije levotiroksina i da je adekvatno dizajniran. Predviđeni i farmakokinetički parametri dobijeni u *in vivo* studiji prikazani su u tabeli 46.

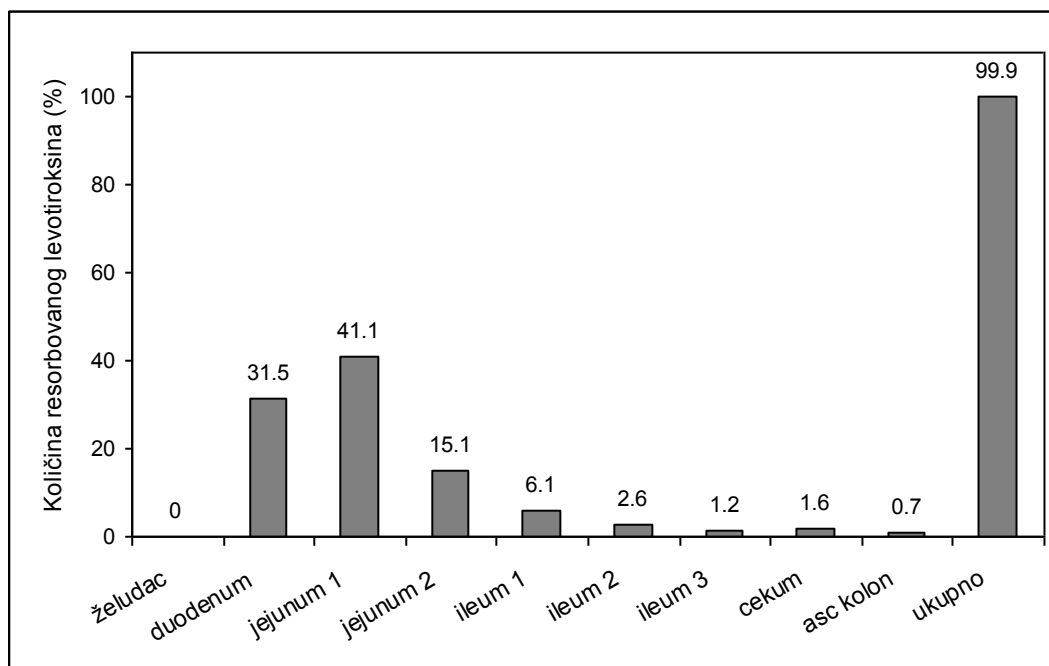
**Tabela 46.** Poređenje farmakokinetičkih parametara izračunatih na osnovu srednjeg profila koncentracije levotiroksina u plazmi dobijenog u *in vivo* studiji sa simuliranim vrednostima

Parametar	<i>In vivo</i> vrednost	Simulirana vrednost		% PE	
		neoptimizovani	optimizovani	neoptimizovani	optimizovani
		ASF	ASF	ASF	ASF
$C_{\max}$ (ng/ml)	29.16	23.17	26.87	20.54	7.85
$PIK_{0-\infty}$ (ngh/ml)	173.30	167.07	166.67	3.59	3.82
$PIK_{0-t}$ (ngh/ml)	147.03	134.24	139.44	8.70	5.16
$t_{\max}$ (h)	1.66	2.37	1.77	-42.77	-6.63

*GastroPlus<sup>TM</sup>* predviđeni profili resorpcije i *in vivo* rastvaranja prikazani su na slici 26. Na osnovu simuliranog profila regionalne resorpcije levotiroksina iz digestivnog trakta prikazanog na slici 27 se vidi da se najveća količina levotiroksina (96.6%), primenjenog u obliku tableta sa trenutnim oslobađanjem, resorbuje u duodenumu i jejunumu, što je u skladu sa literaturnim podacima [29]. Literaturni podaci takođe ukazuju da se nakon oralne primene resorbuje 40 do 80% primenjene doze levotiroksina. Međutim, *GastroPlus<sup>TM</sup>* je predvideo da se resorbuje 99.9% levotiroksina. S obzirom da se radi o endogenoj supstanci, pouzdano određivanje obima resorpcije, kao i identifikacija potencijalnih mehanizama uključenih u ovaj proces je veoma složena i potrebna su dodatna istraživanja kako bi se razvio *in silico* model za njihovo predviđanje.



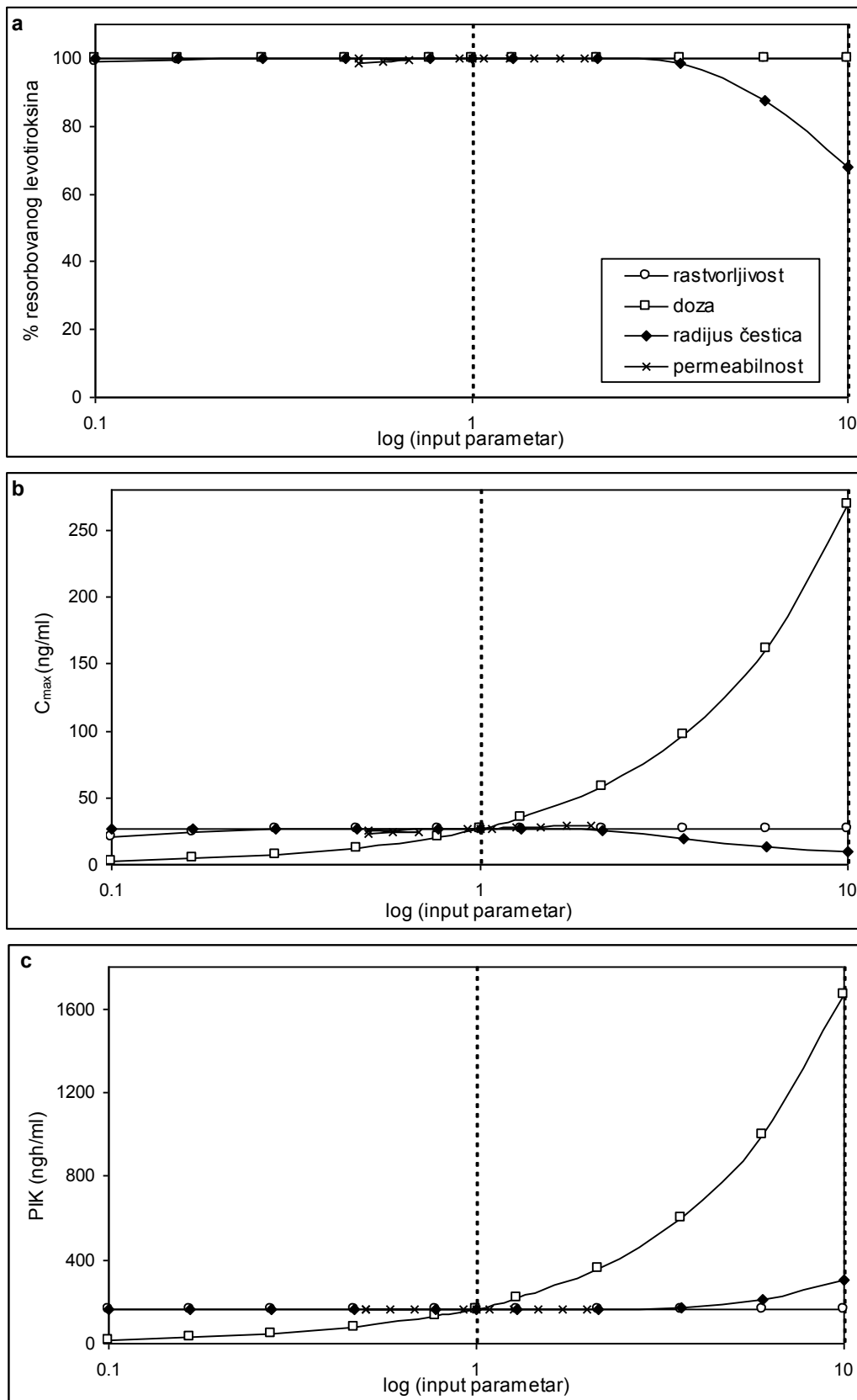
**Slika 26.** *GastroPlus<sup>TM</sup>* simulirani profil resorpcije i rastvaranja levotiroksina na osnovu optimizovanih ASF vrednosti (osenčena oblast predstavlja region u kome brzina rastvaranja ne utiče na resorpciju)



**Slika 27.** Regionalna resorpcija levotiroksina

Nakon razvoja modela za predviđanje resorpcije levotiroksina, PSA je ponovo sprovedena za procenu uticaja rastvorljivosti, doze levotiroksina, radijusa čestica i permeabilnosti (slika 28). Vrednosti navedenih parametara varirane su u opsegu od 1/10 do 10 puta veće vrednosti u odnosu na vrednost koja je inicijalno korišćena u simulaciji, osim za permeabilnost, koja je varirana u opsegu od 1/2 do 2 puta. Rezultati PSA su pokazali da stepen resorpcije gotovo ne zavisi od navedenih faktora. Kompletna resorpcija leka se može postići za vrednosti veličine čestica do 60  $\mu\text{m}$ . Simulacija uticaja rastvorljivosti i permeabilnosti u celom ispitivanom opsegu, kao i simulacija uticaja veličine čestica za vrednosti do 40  $\mu\text{m}$  nije imala značajnog uticaja na vrednost  $C_{\text{max}}$ . Rezultati PSA su takođe pokazali dozno-zavisno povećanje  $C_{\text{max}}$  i PIK, što je u skladu sa literaturnim podacima [30], kao i neosetljivost PIK na varijacije vrednosti rastvorljivosti i permeabilnosti u celom navedenom opsegu, kao i u opsegu veličine čestica do 60  $\mu\text{m}$ .

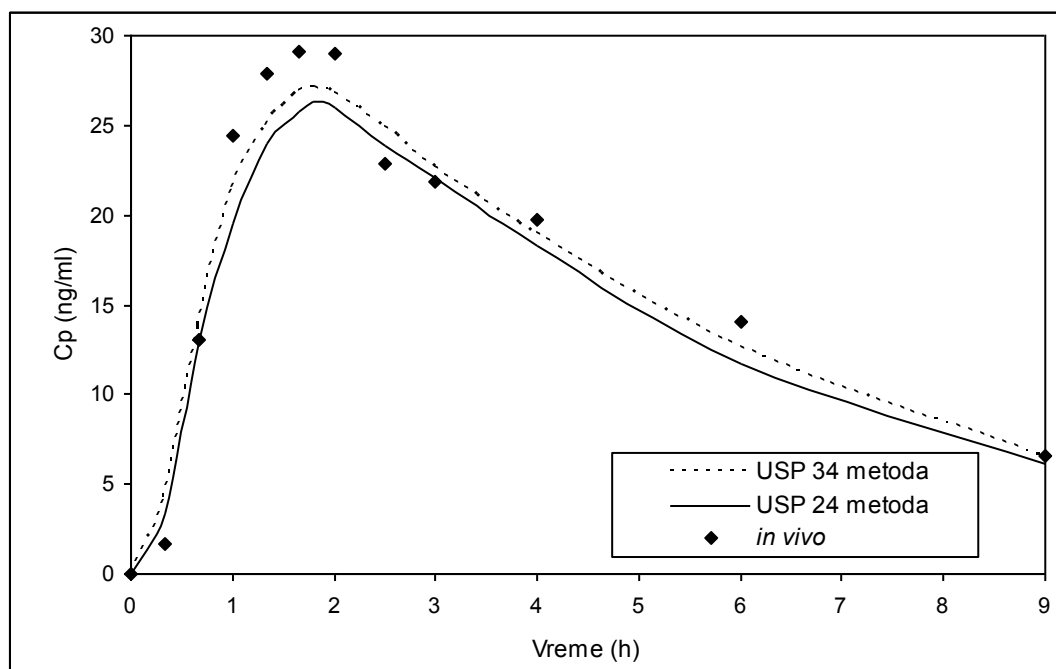




**Slika 28.** Analiza osetljivosti parametara (PSA): zavisnost stepena resorpcije levotiroksina (a),  $C_{max}$  (b) i PIK (c) od vrednosti izabranih ulaznih parametara. Centar X-ose predstavlja polaznu vrednost ispitivanog parametra koja je korišćena u simulacijama

### 5.3.3 Uticaj brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz tableta na resorpciju leka

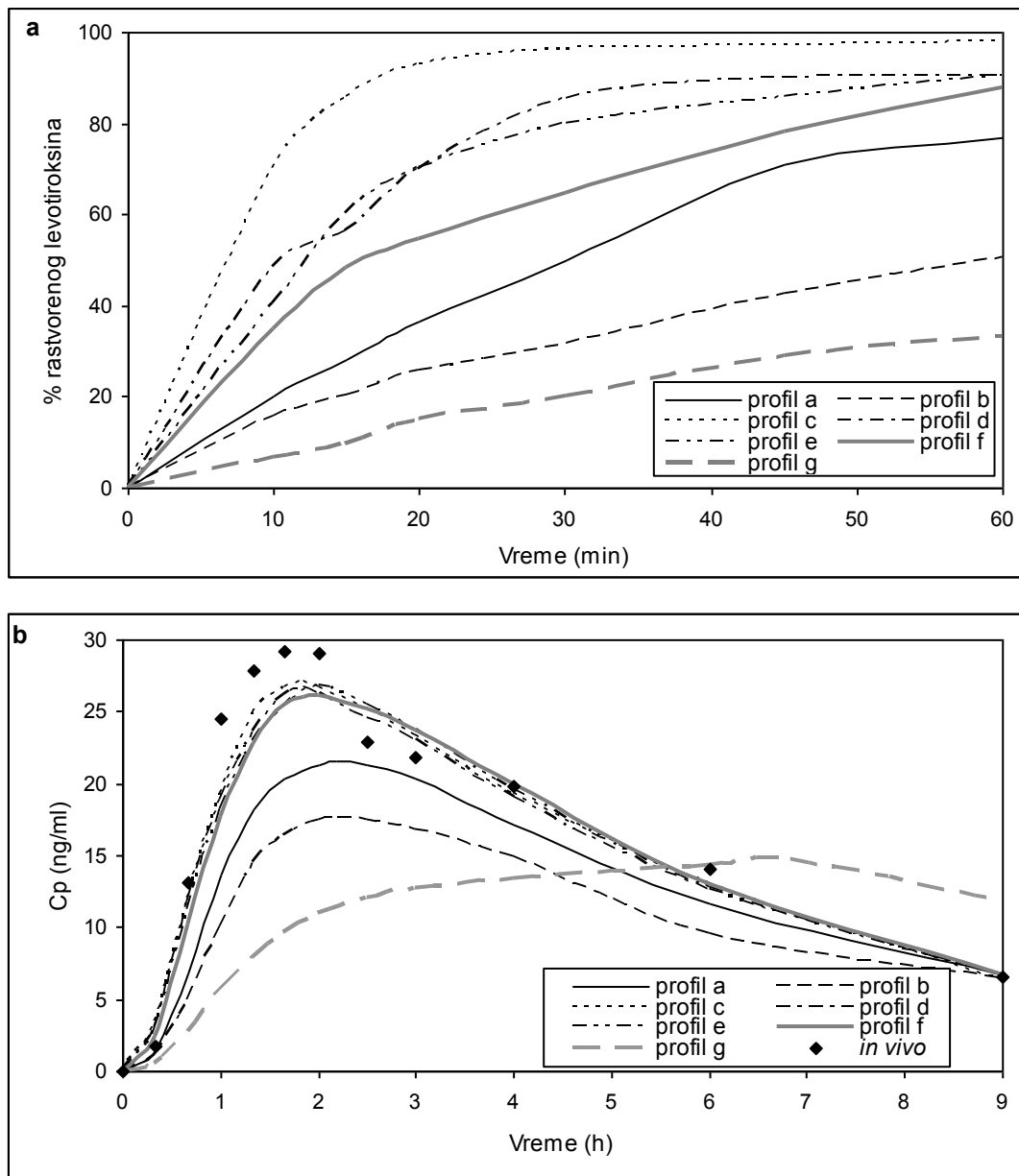
Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz tableta, dobijeni primenom eksperimentalnih uslova datim u USP 34 i USP 24 (slika 8), korišćeni su kao ulazni podaci u modulu pojedinačne simulacije *GastroPlus*<sup>TM</sup> programa, sa ciljem da se ispita uticaj *in vitro* brzine rastvaranja na simulaciju profila koncentracije levotiroksina u plazmi u funkciji vremena. Kao ulazni parametar za simulacije je takođe korišćen set virtuelnih profila, konstruisanih na osnovu ekperimentalnih i literaturnih podataka i farmakopejskih zahteva za test brzine rastvaranja za tablete sa trenutnim oslobađanjem levotiroksin-natrijuma. Ovi profili generisani su tako da simuliraju situaciju kada se a) najmanje 70% leka rastvori za 45 minuta (USP 34 zahtev) i kada se b) najmanje 55% leka rastvori za 80 minuta (USP 24 zahtev), kao i slučajeve kada se c) najmanje 85% leka rastvori za 15 minuta (veoma brzo rastvaranje), d) za 30 minuta (brzo rastvaranje), e) za 45 minuta, f) za 60 minuta i kada je g) nepotpuno rastvaranje (tabela 47). Profili simulirani na osnovu eksperimentalnih rezultata prikazani su na slici 29. Virtuelni profili brzine rastvaranja i odgovarajući simulirani profili prikazani su na slici 30.



**Slika 29.** Simulirani *in vivo* profili koncentracije levotiroksina u plazmi na osnovu eksperimentalno dobijenih profila brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz referentnog preparata, zajedno sa *in vivo* uočenim profilom

**Tabela 47.** Virtuelni profili brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma korišćeni u simulacijama

Vreme (min)	% rastvorenog levotiroksin-natrijuma						
	profil a	profil b	profil c	profil d	profil e	profil f	profil g
0	0	0	0	0	0	0	0
10	20.11	15.60	70.15	48.12	40.23	35.02	6.90
15	28.12	20.00	85.91	56.35	59.90	48.51	9.87
20	36.70	25.81	92.66	69.89	70.14	54.74	15.2
30	49.87	31.56	96.16	85.18	79.90	64.70	20.10
45	70.80	42.33	97.15	89.87	85.56	78.02	29.00
60	77.01	50.42	97.88	90.18	90.33	88.10	33.21



**Slika 30.** Virtuelni profili brzine rastvaranja (a) i odgovarajući simulirani *in vivo* profili koncentracije levotiroksina u plazmi, zajedno sa *in vivo* uočenim profilom koncentracije levotiroksina u plazmi (b)

Profil brzine rastvaranja dobijen u skladu sa eksperimentalnim uslovima navedenim u USP 34 (trenutno važeća monografija) odgovarao je kriterijumu za veoma brzo rastvaranje (“*very rapid dissolution*”, više od 85% supstance rastvoreno za 15 minuta od početka testa). Sa druge strane, oslobađanje levotiroksin-natrijuma iz tableta u fosfatnom puferu (uslovi nekada važeći u USP 24) je bilo sporije i postepeno, pri

čemu je više od 85% supstance rastvoreno za 30 minuta. Iako su dobijeni profili brzine rastvaranja bili međusobno različiti (izračunata  $f_2$  vrednost je bila 42.1), *GastroPlus*<sup>TM</sup> predviđeni farmakokinetički profili su bili dosta slični i dobro su se slagali sa *in vivo* uočenim podacima. Rezultati simulacija kada su kao ulazni parametri korišćeni virtuelni profili, konstruisani tako da oslikavaju različite brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma, pokazali su da se varijacije u kinetici brzine rastvaranja odražavaju na predviđene *in vivo* profile. Ipak, može se primetiti da su razlike u kinetici rastvaranja lekovite supstance *in vitro* mnogo manje izražene kod *GastroPlus*<sup>TM</sup> predviđenih profila koncentracije levotiroksina u plazmi (profili c, d, e i f su se skoro preklapali) (slika 30). Najveće odstupanje od *in vivo* profila je primećeno za profil g, koji predstavlja slučaj gde je oslobađanje lekovite supstance sporo i nepotpuno. Sa druge strane, nije bilo značajnih razlika u predviđenim profilima bez obzira da li se više od 85% supstance rastvorilo za 15 minuta ili za 60 minuta. Farmakokinetički parametri predviđeni na osnovu različitih *in vitro* profila brzine rastvaranja prikazani su u tabeli 48.

**Tabela 48.** Farmakokinetički parametri predvideni na osnovu različitih ulaznih profila brzine rastvaranja

<i>In vitro</i> profil	C <sub>max</sub> (ng/ml)	% PE	PIK <sub>0-∞</sub> (ngh/ml)	% PE	PIK <sub>0-t</sub> (ngh/ml)	% PE	t <sub>max</sub> (h)	% PE
USP 34 metoda	27.09	7.10	166.71	3.80	138.65	5.70	1.81	9.04
USP 24 metoda	26.30	9.81	156.63	9.62	132.99	9.55	1.80	8.43
profil a	21.50	27.77	157.27	9.25	119.56	18.68	2.19	31.93
profil b	17.57	39.75	148.43	14.35	90.53	38.43	2.20	32.53
profil c	26.99	7.44	166.67	3.82	138.95	5.49	1.86	12.05
profil d	26.61	8.74	173.00	0.17	131.54	10.53	1.86	12.05
profil e	26.80	8.09	166.66	3.83	137.83	6.26	2.00	20.48
profil f	26.10	10.49	166.67	3.82	136.76	6.98	1.86	12.05
profil g	14.68	49.66	177.87	2.64	104.80	28.72	6.84	312.05
<i>in vivo</i> vrednost	29.16		173.30		147.03		1.66	

### 5.3.4 *In vitro-in vivo* korelacije

Za uspostavljanje IVIVK korišćeni su rezultati *in vivo* studije bioekvivalencije i virtuelni i eksperimentalno dobijeni profili brzine rastvaranja lekovite supstance iz pojedinačnih tableta. Naime, ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz zbirnog uzorka onemogućava identifikaciju varijabilnosti na nivou pojedinačnog lekovitog oblika, jer će krajnji rezultat biti prosečna vrednost brzine rastvaranja zbirnog uzorka. Iako su rezultati za brzinu rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz zbirnog uzorka u 0.01 M HCl sa 0.2% NaLS bili zadovoljavajući, ispitivanje brzine rastvaranja ipak treba izvoditi sa pojedinačnim tabletama, kako bi se pravilno procenio kvalitet preparata i osigurala njegova efikasnost i bezbednost.

#### 5.3.4.1 Višestruka korelacija nivoa C

U cilju uspostavljanja višestruke korelacije nivoa C, parcijalne površine ispod simuliranog profila zavisnosti koncentracije levotiroksina od vremena nakon 1, 2 i 3 h (11.199, 35.717 i 60.559 ng/ml), izračunate metodom trapezoida, upoređene su sa kumulativnom količinom rastvorene supstance nakon 10, 20 i 30 minuta, pri čemu su korišćeni eksperimentalni i virtuelni profili brzine rastvaranja (slika 8 i slika 30). Zbog razlike u brzini rastvaranja *in vitro* i *in vivo* (u *in vitro* uslovima je proces rastvaranja znatno brži nego u uslovima u organizmu), bilo je neophodno korišćenje faktora korekcije vremena, kako bi se mogla uspostaviti korelacija između navedenih podataka [111]. Tako su vrednosti parcijalnih PIK dobijenih u prva tri sata (60, 120 i 180 minuta) poređene sa procentom oslobođene supstance nakon 6 puta manjih vremenskih intervala (10, 20 i 30 minuta). Odgovarajući statistički parametri dati su u tabeli 49, a korelacioni dijagram je prikazan na slici 31.

Visoke vrednosti koeficijenata korelacije dobijene su kod svih profila. Međutim, vrednosti nagiba prave su se međusobno dosta razlikovale, pri čemu je najveće odstupanje od jedinice uočeno kod virtuelnih profila a i b, koji predstavljaju USP 34 i USP 24 zahteve za test brzine rastvaranja tableta levotiroksin-natrijuma, kao i kod profila g, koji simulira nepotpuno rastvaranje supstance iz tableta, što ukazuje da kod ovih profila ne postoji zadovoljavajuća korelacija sa *in vivo* podacima. Visok stepen korelacije između izabranih *in vitro* i *in vivo* podataka u ostalim slučajevima ukazuje na

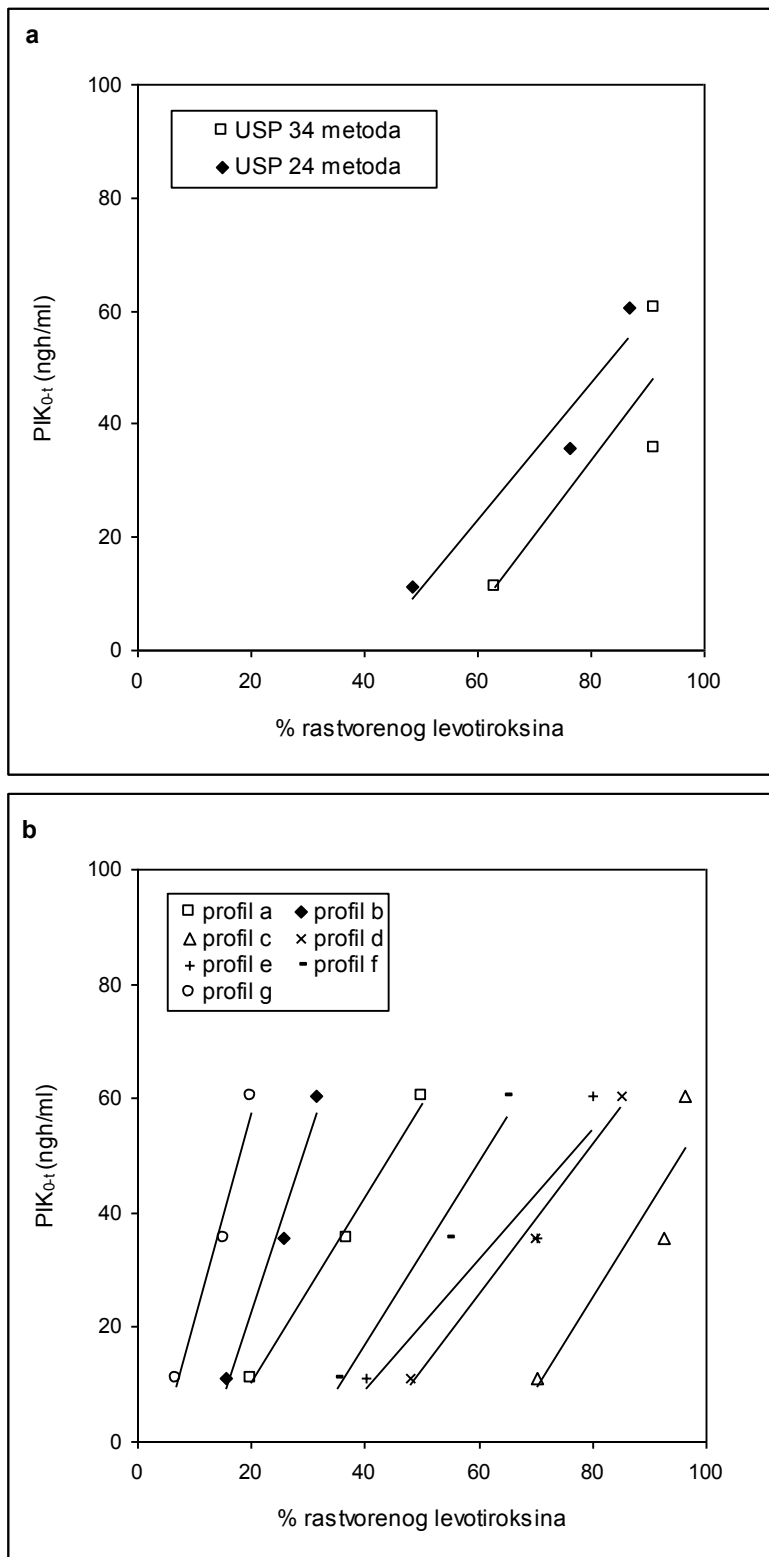
postojanje višestruke IVIVK nivoa C. Volpato i saradnici su takođe u svom radu ispitali mogućnost uspostavljanja ovog nivoa korelacije za tablete levotiroksina, pri čemu su koristili samo rezultate ispitivanja brzine rastvaranja u skladu sa USP 34 i USP 24 uslovima; visok stepen korelacije dobijen je samo za *in vitro* podatke dobijene prema nekada važećim USP 24 zahtevima [27].

**Tabela 49.** Statistički parametri višestruke *in vitro-in vivo* korelacije nivoa C

<i>In vitro</i> profil	a*	r*
USP 34 metoda	1.3094	0.8661
USP 24 metoda	1.2042	0.9652
profil a	3.6503	0.9975
profil b	3.0131	0.9867
profil c	1.2083	0.9198
profil d	1.2179	0.9946
profil e	1.1444	0.9585
profil f	1.2678	0.9819
profil g	3.6782	0.9877

\*a: nagib pravca, r: koeficijent korelacije





**Slika 31.** Višestruka IVIVK nivoa C između parcijalnih PIK nakon 1, 2 i 3 h i kumulativne količine rastvorenog levotiroksina nakon 10, 20 i 30 min: na osnovu eksperimentalnih *in vitro* profila (a) i na osnovu virtuelnih *in vitro* profila (b)

### 5.3.4.2 Korelacija nivoa A

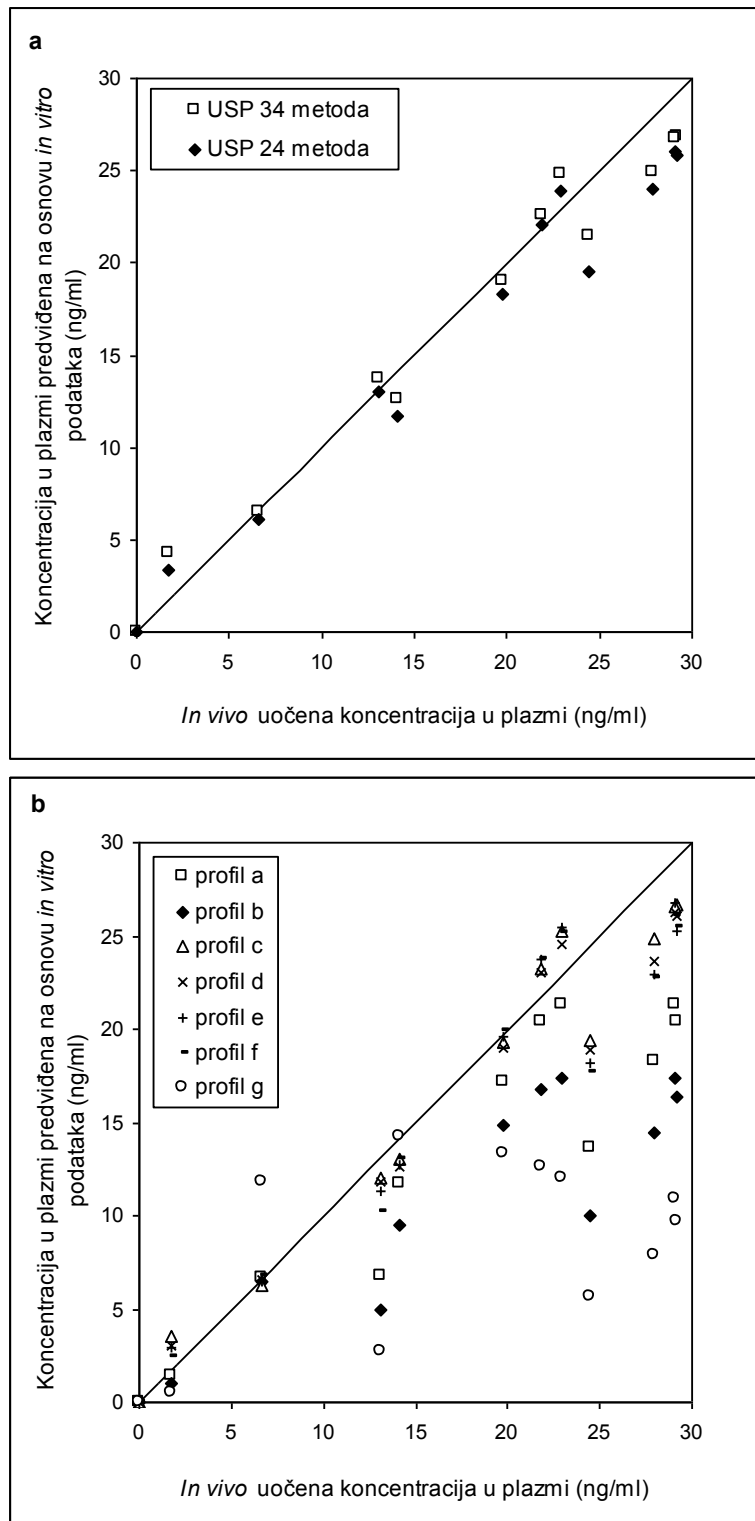
Uspostavljanje višestruke korelacije nivoa C je ukazalo da između *in vitro* i *in vivo* podataka takođe može postojati viši stepen korelacije, odnosno korelacija nivoa A.

Za uspostavljanje IVIVK nivoa A korišćen je konvolucioni pristup. Primenjena metoda konvolucije bazirana je na ACAT modelu implementiranom u *GastroPlus*<sup>TM</sup> softveru [140]. Kao *in vitro* ulazna komponenta korišćeni su eksperimentalni i virtuelni profili brzine rastvaranja tableta sa trenutnim oslobađanjem levotiroksin-natrijuma. Profili koncentracije levotiroksina u plazmi, predviđeni na osnovu ulaznih profila brzine rastvaranja, upoređeni su sa srednjim profilom koncentracije levotiroksina u plazmi uočenim *in vivo* (slike 29 i 30). Odgovarajući statistički parametri dati su u tabeli 50. Korelacioni dijagram dobijen poređenjem odgovarajućih vrednosti predviđenih na osnovu *in vitro* podataka sa profilom uočenim *in vivo* prikazan je na slici 32.

**Tabela 50.** Statistički parametri *in vitro-in vivo* korelacije nivoa A

<i>In vitro</i> profil	a*	r*
USP 34 metoda	0.8905	0.9874
USP 24 metoda	0.8789	0.9847
profil a	0.7069	0.9074
profil b	0.5608	0.9112
profil c	0.9042	0.9803
profil d	0.8999	0.9793
profil e	0.9109	0.9672
profil f	0.8714	0.9637
profil g	0.2609	0.5331

\*a: nagib pravca, r: koeficijent korelacije



**Slika 32.** IVIVK nivoa A za tablete levotiroksina: simulacije na osnovu eksperimentalnih *in vitro* podataka (a) i simulacije na osnovu virtuelnih *in vitro* profila (b)

Vrednosti nagiba regresione prave približne jedinici, kao i visoke vrednosti koeficijenta korelacije dobijene kod profila c, d, e i f pokazali su postojanje IVIVK nivoa A. Visok nivo korelacije je takođe dobijen za profile simulirane na osnovu eksperimentalnih podataka dobijenih za brzinu rastvaranja u skladu sa uslovima datim u USP 34 i USP 24. Niži stepen korelacije dobijen je za virtuelne profile koji predstavljaju farmakopejske zahteve za brzinu rastvaranja (tabela 50). Ova kontradiktornost se može objasniti kinetikom brzine rastvaranja koja je uočena *in vitro*. Naime, oslobađanje iz ispitivanih tableta je bilo brzo i kompletno pod svim ispitanim eksperimentalnim uslovima. Ipak, rezultati gastrointestinalnih simulacija u kombinaciji sa IVIVK su pokazali da se postojeći zahtevi za brzinu rastvaranja za tablete sa trenutnim oslobađanjem levotiroksin-natrijuma ne mogu smatrati biorelevantnim. Na slici 26 se može videti da krive koje predstavljaju količinu rastvorenog i količinu resorbovanog leka međusobno divergiraju, ukazujući na to da je permeabilnost, a ne brzina rastvaranja ograničavajući faktor za resorpciju leka. Na osnovu dobijenih rezultata, kao biorelevantan zahtev za test brzine rastvaranja za tablete sa trenutnim oslobađanjem levotiroksin-natrijuma mogao bi se predložiti zahtev po kome se najmanje 85% lekovite supstance rastvori u roku od 60 minuta.

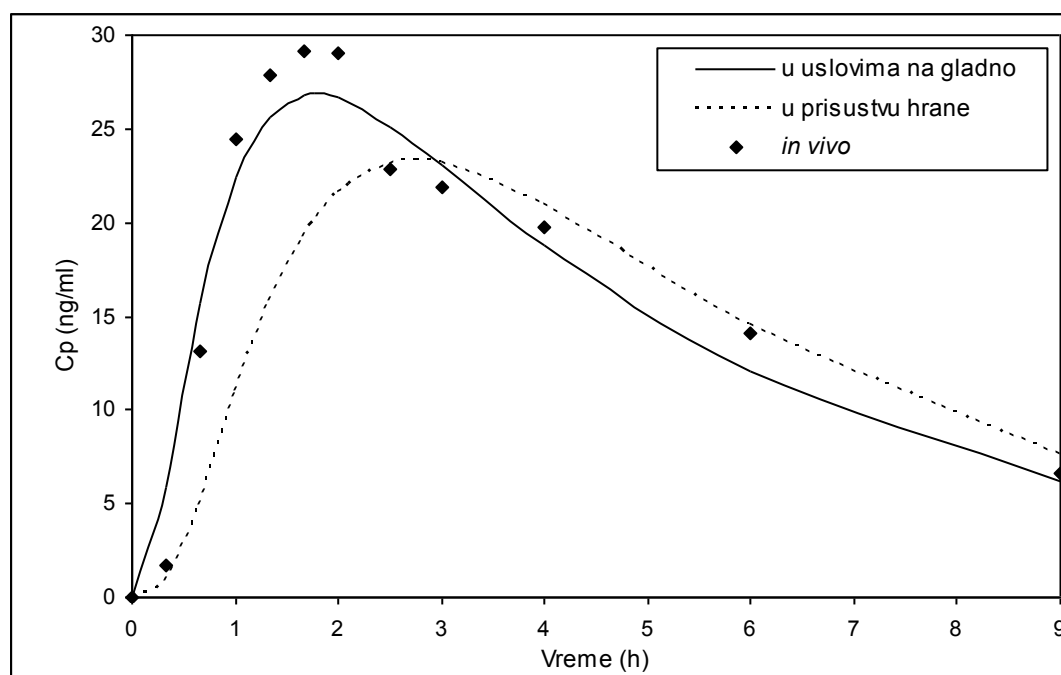
### **5.3.5 Simulacija resorpcije levotiroksina u prisustvu hrane**

U simulacijama resorpcije levotiroksina iz gastrointestinalnog trakta u prisustvu hrane korišćeni su fizičko-hemijski i farmakokinetički parametri prikazani u tabeli 44, kao i fiziološki sistem humanog gastrointestinalnog trakta u uslovima nakon primene obroka. Predviđene vrednosti farmakokinetičkih parametara su prikazane u tabeli 51. Simulirani profil koncentracije levotiroksina u plazmi u zavisnosti od vremena, u uslovima nakon primene obroka, kao i u uslovima na gladno, prikazan je na slici 33.

Rezultati simulacija ukazuju da prisustvo hrane značajno utiče na brzinu resorpcije levotiroksina, ali ne i na stepen resorpcije. Zvanične preporuke za režim doziranja tableta levotiroksina podrazumevaju njihovu primenu ujutru, pre obroka. Međutim, kako se u literaturi ne mogu pronaći podaci o profilu koncentracije levotiroksina u funkciji vremena nakon primene obroka, ne postoji mogućnost poređenja dobijenih simuliranih vrednosti sa realnim *in vivo* podacima i validacija ovakvog modela bi zahtevala dodatna ispitivanja *in vivo*.

**Tabela 51.** Poređenje farmakokinetičkih parametara dobijenih simulacijama u uslovima na gladno i u prisustvu hrane

Parametar	<i>In vivo</i> vrednost	Simulirana vrednost	
		uslovi na gladno	u prisustvu hrane
$C_{\max}$ (ng/ml)	29.16	26.87	23.26
$PIK_{0-\infty}$ (ngh/ml)	173.30	166.67	166.92
$PIK_{0-t}$ (ngh/ml)	147.03	139.44	133.32
$t_{\max}$ (h)	1.66	1.77	2.76



**Slika 33.** *GastroPlus*<sup>TM</sup> simulirani profili koncentracije levotiroksina u plazmi nakon oralne primene tableta levotiroksina u dozi od 600 µg u uslovima na gladno i u prisustvu hrane i *in vivo* uočeni profil u uslovima na gladno

### 5.3.6 Virtuelna studija

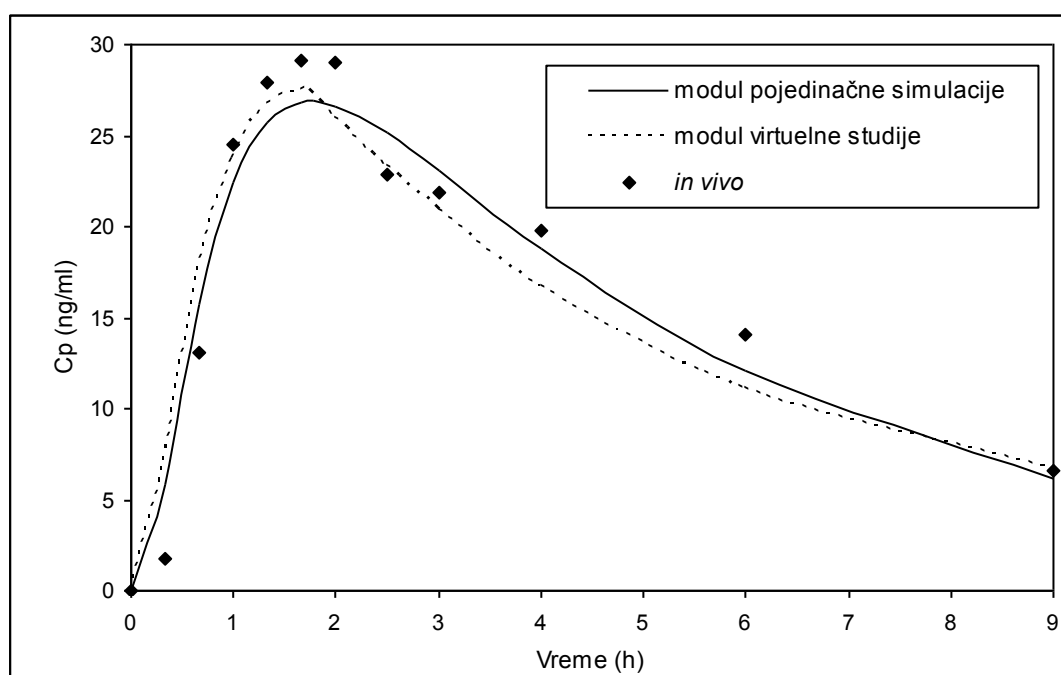
Resorpcioni model za levotiroksin, razvijen u modulu pojedinačne simulacije, iskorišćen je za procenu dispozicije ove supstance u većoj populaciji ispitanika primenom modula za izvođenje virtuelnih studija u *GastroPlus<sup>TM</sup>* softveru (*Virtual trial mode*). Virtuelne studije predstavljaju simulirana klinička ispitivanja sa do 2500 virtuelnih ispitanika, pri čemu je simulacija kod svakog ispitanika zasnovana na jedinstvenom randomizovanom setu fizioloških i farmakokinetičkih parametara. Prilikom izvođenja ovakvih simulacija na izabranom broju ispitanika, uticaj različitih parametara na resorpciju leka se procenjuje na osnovu niza simulacija u kojima se način variranja nekog parametra vrši na osnovu izabrane raspodele i unetog stepena varijacije datog parametra u izabranoj populaciji.

Dispozicija levotiroksina je u ovom modulu predviđena sprovođenjem virtuelne studije na 100 ispitanika. Naime, preliminarne simulacije sa različitim brojem ispitanika (25, 50, 75, 100 i 500 ispitanika) pokazale su da su rezultati virtuelnih studija sa 100 i više ispitanika najpribližniji rezultatima *in vivo* studije. Doza, volumen tečnosti sa kojom se uzima doza, molekulska masa, logP, pKa, gustina čestica i difuzioni koeficijent su izabrani kao fiksne vrednosti, dok su ostali parametri kao što su efektivna permeabilnost, vreme intestinalnog tranzita, telesna masa ispitanika i klirens definisani kao varijabilni sa log-normalnom raspodelom (tabela 52). Varijabilnost za telesnu masu ispitanika, volumen distribucije i klirens je definisana na osnovu vrednosti CV dobijenih u *in vivo* studiji. Rezultati virtuelne studije upoređeni su sa rezultatima pojedinačnih simulacija, kao i sa podacima iz *in vivo* studije.

Farmakokinetički parametri predviđeni u virtuelnoj studiji su se vrlo dobro slagali sa *in vivo* rezultatima (slika 34), a sve izračunate greške predviđanja su bile manje od 10% (tabela 53). Srednje vrednosti predviđenih parametara su bile bliske i vrednostima dobijenim u pojedinačnim simulacijama sprovedenim u cilju validacije modela, potvrđujući da je resorpcioni model specifičan za levotiroksin adekvatno dizajniran i da uspešno predviđa njegovo ponašanje u organizmu. Na ovaj način se može potvrditi da je varijabilnost prilikom izvođenja virtuelne studije adekvatno prezentovana, jer je uočeno dobro slaganje između simuliranih i *in vivo* uočenih vrednosti.

**Tabela 52.** Parametri korišćeni u simulaciji virtuelne studije

Parametar	Donja granica	Srednja vrednost	Gornja granica	CV (%)
permeabilnost (cm/s x 10 <sup>-4</sup> )	0.73	1.34	2.44	20
vreme prolaska kroz tanko crevo (h)	1.761	3.209	5.847	20
telesna masa (kg)	40.79	70	120.12	18
Vc (L)	0.077	0.22	0.629	30
Cl (L/h)	0.803	3.6	16.134	50
duodenum ASF	3.868	5.221	7.048	10
jejunum 1 ASF	3.800	5.130	6.924	10
jejunum 2 ASF	3.760	5.076	6.852	10



**Slika 34.** Simulirani profili koncentracije levotiroksina u plazmi: modul pojedinačne simulacije (a) i modul virtuelne studije na 100 ispitanika, zajedno sa profilom koncentracije levotiroksina u zavisnosti od vremena zapaženim *in vivo* (b)

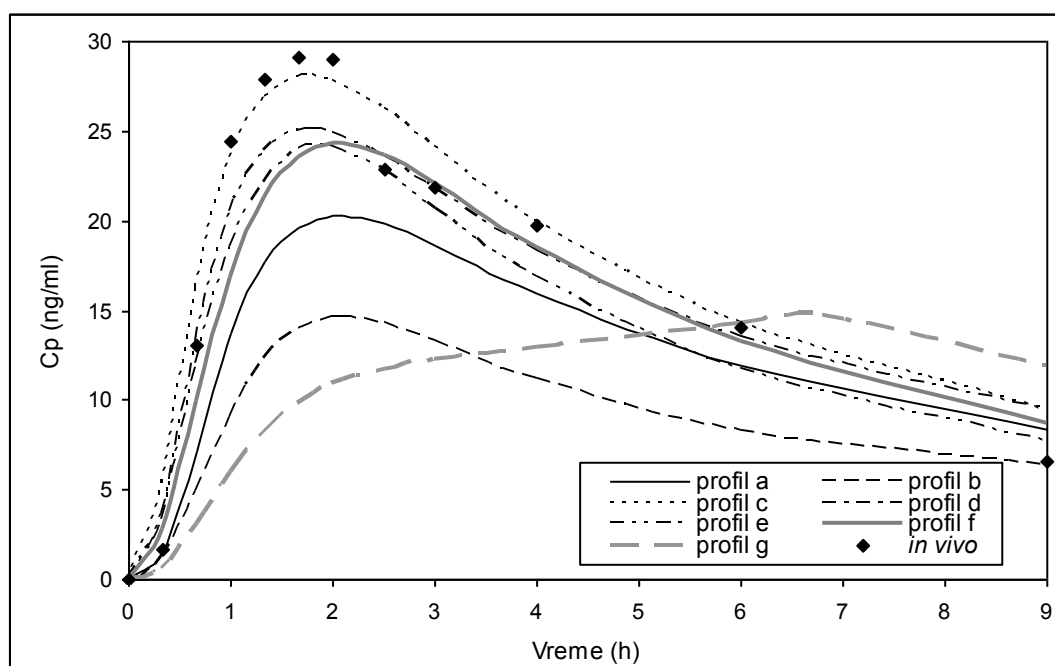
**Tabela 53.** Farmakokinetički parametri i greške predviđanja

Parametar	Predviđen I*	Predviđen II**	<i>In vivo</i>	%PE I*	%PE II**
$C_{max}$ (ng/ml)	26.87	27.54	29.16	7.85	5.56
$PIK_{0-\infty}$ (ngh/ml)	166.67	167.70	173.30	3.82	3.23
$PIK_{0-t}$ (ngh/ml)	139.44	132.84	147.03	5.16	9.65
$t_{max}$ (h)	1.77	1.74	1.66	-6.63	-4.82

\* modul pojedinačne simulacije

\*\* modul virtuelne studije

Sa ciljem da se ispita uticaj *in vitro* brzine rastvaranja na simulaciju profila koncentracije levotiroksina u funkciji vremena, takođe su urađene virtuelne studije na 100 ispitanika, pri čemu su kao ulazni parametri korišćeni virtuelni profili prikazani u tabeli 47. Simulirani profili prikazani su na slici 35.



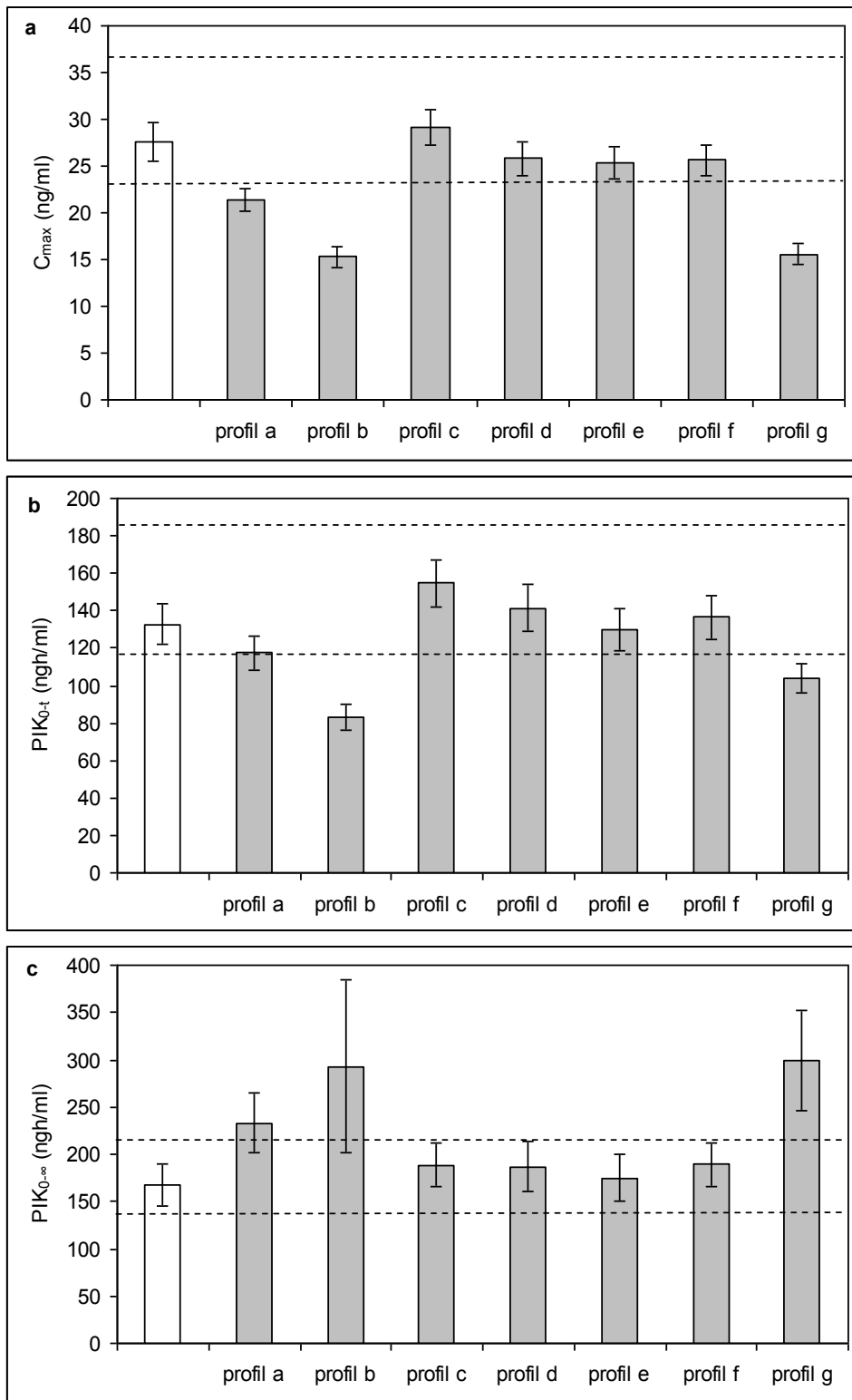
**Slika 35.** Profili koncentracije levotiroksina u plazmi, simulirani u modulu virtuelne studije na osnovu seta virtuelnih profila brzine rastvaranja, zajedno sa profilom koncentracije levotiroksina u zavisnosti od vremena zapaženim *in vivo*



Kako u *GastroPlus*<sup>TM</sup> softveru ne postoji mogućnost prikaza svakog pojedinačnog simuliranog profila u okviru virtuelne studije, nije moguće poređenje sa individualnim profilima iz *in vivo* studije. Zato su 90% CI za simulirane vrednosti  $C_{max}$ ,  $PIK_{0-\infty}$  i  $PIK_{0-t}$  dobijene u osnovnoj virtuelnoj studiji i u studijama sa virtuelnim profilima brzine rastvaranja upoređeni sa eksperimentalno dobijenim vrednostima za referentni preparat u *in vivo* studiji.

Svi izračunati 90% CI za vrednosti  $C_{max}$ ,  $PIK_{0-\infty}$  i  $PIK_{0-t}$  dobijene u osnovnoj virtuelnoj studiji su se nalazili u opsegu 80-125% u odnosu na eksperimentalno dobijene srednje vrednosti farmakokinetičkih parametara (slika 36).

90% CI za vrednosti  $C_{max}$ ,  $PIK_{0-\infty}$  i  $PIK_{0-t}$ , simuliranih kada su kao ulazni parametri korišćeni profili c, d, e i f, takođe su bili u opsegu 80-125% u odnosu na eksperimentalne vrednosti (slika 36). Iz priloženih rezultata se može videti da nije uočena značajna razlika između predviđenih farmakokinetičkih parametara sve do profila u kom je više od 85% oslobođeno za 60 minuta, u poređenju sa *in vivo* uočenim profilom za referentni preparat. Na osnovu ovih simulacija se takođe može zaključiti da brzina rastvaranja neće biti ograničavajući faktor za resorpciju levotiroksina, što je u skladu sa rezultatima pojedinačnih simulacija. Manje brzine rastvaranja levotiroksina iz tableta se mogu tolerisati jer neće uticati na sveukupnu resorpciju. Zato i znatno veće razlike između profila brzine rastvaranja razvojne formulacije i referentnog preparata mogu biti prihvatljive, što je u skladu sa aktuelnim debatama o važećim kriterijumima za  $f_2$  vrednosti kada je u pitanju uporedno ispitivanje brzine rastvaranja lekovitih oblika sa trenutnim oslobađanjem aktivne supstance [83].



**Slika 36.** Predvideni  $C_{max}$  (a),  $PIK_{0-t}$  (b) i  $PIK_{0-\infty}$  (c) u osnovnoj virtuelnoj studiji (bela kolona) i virtuelnim studijama za simulaciju različitih brzina rastvaranja (sive kolone), zajedno sa 90% CI; isprekidane linije predstavljaju interval 80-125% u odnosu na eksperimentalno dobijene vrednosti

### 5.3.7 Mogućnost primene *biowaiver* koncepta

Na osnovu rezultata sprovedenih simulacija, kao i eksperimentalno određenog profila rastvorljivosti levotiroksina, može se izvesti zaključak da rastvorljivost levotiroksina nije ograničavajući faktor za njegovu resorpciju. U skladu sa tim, levotiroksin se može klasifikovati kao lek intermedijerne rastvorljivosti, pri čemu resorpcija nakon oralne primene neće biti ograničena rastvorljivošću. Podaci o permeabilnosti nisu u potpunosti relevantni i na osnovu njih se može zaključiti da se levotiroksin nalazi na granici između lekova niske i visoke permeabilnosti [15, 21, 22]. Postoje preporuke da se lekovi koji imaju stepen resorpcije između 45 i 85% mogu smatrati kao lekovi intermedijerne permeabilnosti i da takođe mogu biti kandidati za *biowaiver*-e [83]. Na osnovu svih dobijenih rezultata se može zaključiti da se levotiroksin nalazi na granici između BCS grupe I i BCS grupe III. Rezultati dobijeni metodom gastrointestinalne simulacije, u kombinaciji sa IVIVK, pokazuju da su predviđeni *in vivo* farmakokinetički profili relativno neosetljivi na promene u kinetici brzine rastvaranja. Dakle, može se pretpostaviti da i brzina rastvaranja lekovite supstance iz tableta nije ograničavajući faktor za resorpciju levotiroksina. Resorpcija će, pre svega, biti ograničena biofarmaceutskim i fiziološkim faktorima, a ne faktorima formulacije, pod uslovom da ekscipijensi prisutni u ispitivanim formulacijama ne utiču na gastrointestinalnu permeabilnost, i, posledično, na resorpciju leka. Ovakvi rezultati *in silico* simulacija su u saglasnosti sa publikovanim studijama u kojima je dokazana biološka ekvivalentnost preparata koji su pokazali *in vitro* različite brzine rastvaranja levotiroksina, kao i sa studijama u kojima je potvrđena biološka ekvivalentnost između tableta i oralnog rastvora levotiroksina [27, 175-179]. Ovakva saznanja omogućavaju postavljanje znatno šire specifikacije testa brzine rastvaranja levotiroksina.

Visoke vrednosti doznog broja za levotiroksin za terapijsku dozu od 600 µg i za rastvorljivost u opsegu pH 4.5-6.8 pokazuju da levotiroksin samo u tom slučaju ne ispunjava uslov za visoko rastvorljivu supstancu. Granična vrednost doznog broja se može tačnije izračunati iz jednačine [71]:

$$F_a = 2 \frac{A_n}{D_0}$$

pri čemu je  $F_a \sim 1$  i  $A_n = 2.663$  (*GastroPlus*<sup>TM</sup> predviđena vrednost).

Na ovaj način se dobija maksimalna granična vrednost doznog broja od 4.53. Kako su sve vrednosti doznog broja prikazane u tabeli 11 manje od izračunate granične vrednosti, može se zaključiti da je rastvorljivost ipak dovoljno visoka u svim delovima gastrointestinalnog trakta i da neće ograničavati resorpciju. Dobijeni rezultati pokazuju da se dovoljna rastvorljivost može postići u svim medijumima u fiziološkom opsegu pH vrednosti i da dodavanje surfaktanta u medijum za test *in vitro* brzine rastvaranja nije potrebno. To dovodi u pitanje opravdanost ispitivanja brzine rastvaranja u skladu sa uslovima u važećoj američkoj farmakopeji, koji podrazumevaju upotrebu medijuma sa 0.2% NaLS. Sa druge strane, podaci dobijeni primenom tehnike gastrointestinalne simulacije u kombinaciji sa IVIVK su pokazali da se i u slučaju manjih brzina rastvaranja levotiroksina iz tableta mogu dobiti koncentracije u plazmi koje se dobro slažu sa *in vivo* vrednostima. U tom slučaju, i fosfatni pufer pH 7.4, koji je prethodno propisivan od strane američke farmakopeje, se može smatrati pogodnim za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja levotiroksina.

Sekrecija levotiroksina je strogo regulisana fiziološkim sistemom povratne sprege i pokazuje veliku interindividualnu varijabilnost. Uzimajući u obzir varijabilnu *in vivo* kinetiku (vrednosti  $t_{max}$  koje se mogu naći u literaturi variraju u opsegu od 1.6 do 4.5 h), kao i varijabilne individualne endogene nivoe hormona, može se pretpostaviti da *in vivo* studije prosečne bioekvivalencije nisu adekvatne za uspostavljanje bioekvivalencije između preparata levotiroksina [179, 181, 187]. Sa druge strane, u literaturi se mogu pronaći radovi u kojima je pokazano da je odsustvo terapijske ekvivalentnosti preparata levotiroksina rezultat neadekvatnog sadržaja aktivne supstance u preparatu i/ili neodgovarajuće brzine rastvaranja [36].

Kako je osnovni cilj studija biološke ekvivalentnosti procena uticaja faktora formulacije na biološku raspoloživost leka, *in silico* metode, kao što je model gastrointestinalne simulacije razvijen u ovoj studiji, koji ne uzima u obzir interindividualnu varijabilnost, mogu se koristiti za davanje objektivne procene biološke raspoloživosti preparata koji sadrže endogene supstance, iako endogeni nivo leka ne može biti uzet u obzir prilikom izvođenja simulacija resorpcije.

Predložena metodologija koja uključuje tehnologiju gastrointestinalne simulacije i IVIVK ukazuje da postoji mogućnost primene *biowaiver* koncepta na generičke preparate koji sadrže levotiroksin. Iako postoje ograničavajući faktori kao što su uska

terapijska širina i varijabilni individualni odgovor na supstitucionu terapiju, koji po trenutno važećim smernicama ne podržavaju ovu *biowaiver* ekstenziju, rezultati ovog istraživanja ukazuju da ove faktore, kao i trenutno važeće regulatorne zahteve, treba dodatno kritički proceniti i razmotriti.

# ZAKLJUČAK

I. Eksperimentalno dobijeni rezultati za rastvorljivost su u skladu sa pretpostavkama vezanim za amfoternu strukturu ove lekovite supstance, koja u zavisnosti od pH jonizuje na različite načine. Na osnovu izračunatih odnosa doza/rastvorljivost i vrednosti doznih brojeva, može se zaključiti da levotiroksin-natrijum, u opsegu doza koje se uobičajeno koriste u terapiji, ispunjava uslov da bude visoko rastvorljiva supstanca u skladu sa kriterijumima BCS sistema.

Ispitivanje brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz ispitivanih preparata u medijumima različitih pH vrednosti je pokazalo da pH vrednost utiče na brzinu rastvaranja. Najveća brzina rastvaranja i kompletno oslobađanje je postignuto u medijumu pH 1.2, dok su količine rastvorenog levotiroksin-natrijuma bile najniže u acetatnom puferu pH 4.5. Rezultati ispitivanja uticaja intenziteta mešanja na brzinu rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz ispitivanih preparata su pokazali da primenjeni intenzitet mešanja takođe ima uticaj na oslobađanje levotiroksin-natrijuma. Ovaj uticaj je bio posebno izražen u slučaju referentnog preparata. Pri svim ispitanim uslovima, oslobađanje levotiroksin-natrijuma iz razvojne formulacije je bilo brzo, sa više od 85% supstance oslobođene za 30 minuta.

Rezultati uporednog ispitivanja brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz ispitivanih preparata su ukazali na izvesne razlike između preparata pri određenim eksperimentalnim uslovima. Različito *in vitro* ponašanje ispitivanih preparata se može objasniti razlikama u sastavu formulacija i primenjenoj tehnologiji izrade. Kako je *in vivo* studija pokazala bioekvivalentnost razvojne formulacije i referentnog preparata i uzimajući u obzir rastvorljivost levotiroksin-natrijuma, razlike uočene *in vitro* nemaju značajan uticaj na *in vivo* ponašanje leka. Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da su brzina i stepen resorpcije levotiroksina pre ograničeni njegovom permeabilnošću, a ne njegovom rastvorljivošću i brzinom rastvaranja. Ovakvi rezultati ukazuju da su važeći regulatorni zahtevi za veoma brzo rastvaranje (više od 85% lekovite supstance rastvorene za 15 minuta), kao i zahtevi da vrednost faktora sličnosti ( $f_2$ ) mora biti veća od 50 isuviše strogi za *biowaiver* koncept za preparate sa trenutnim oslobađanjem koji sadrže visoko rastvorljive lekovite supstance i da ih je potrebno dodatno razmotriti. Kako su sve izračunate  $f_2$  vrednosti prilikom poređenja profila brzine rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz ispitivanih preparata bile veće od 40, moguće je razmotriti manje restriktivne kriterijume za procenu sličnosti između

formulacija, pri čemu bi se u ovom slučaju mogla prihvatiti prosečna razlika od 10 do 16% u količini aktivne supstance oslobođene u istim vremenskim intervalima.

II. Svi dobijeni 90% CI u *in vivo* studiji su odgovarali standardnim kriterijumima za studije bioekvivalencije (0.80-1.25), ali su se u slučaju  $PIK_{0-t}$  i  $PIK_{0-\infty}$ , izračunatih na osnovu koncentracija levotiroksina korigovanih u odnosu na endogeni nivo, nalazili na donjoj granici prihvatljivosti. Na osnovu ovoga se može zaključiti da endogeni nivo levotiroksina ima značajan uticaj na procenu bioekvivalencije, jer maskira relativnu razliku između ispitivanih preparata. Stoga korekcija izmerene ukupne koncentracije levotiroksina u odnosu na endogeni nivo doprinosi pouzdanijoj proceni bioekvivalencije. Rezultati flip-flop analize su takođe odgovarali standardnim kriterijumima za studije bioekvivalencije, ali se nisu nalazili na samim granicama prihvatljivosti ni za jedan od analiziranih farmakokinetičkih parametara. Na taj način je dodatno potvrđena biološka ekvivalentnost ispitivanih preparata.

III. Primenom tehnike gastrointestinalne simulacije pokazano je da se na osnovu izabranih vrednosti ulaznih parametara može sa zadovoljavajućom pouzdanošću simulirati resorpcija levotiroksina. Analiza osetljivosti parametara (PSA) je pokazala da se kompletna resorpcija leka može postići primenom čestica veličine do 60  $\mu\text{m}$  i da stepen resorpcije gotovo ne zavisi od varijacija u vrednostima rastvorljivosti, permeabilnosti i doze. Simulacija uticaja rastvorljivosti i permeabilnosti u celom ispitivanom opsegu, kao i simulacija uticaja veličine čestica za vrednosti do 40  $\mu\text{m}$  je pokazala da se ne očekuje značajan uticaj na vrednosti  $C_{\text{max}}$  i PIK. Rezultati PSA su takođe predvideli dozno-zavisno povećanje  $C_{\text{max}}$  i PIK.

Ispitivanjem uticaja *in vitro* brzine rastvaranja na simulaciju profila koncentracije levotiroksina u plazmi u funkciji vremena zaključeno je da se razlike u kinetici brzine rastvaranja levotiroksina odražavaju na predviđene *in vivo* profile, ali su ipak mnogo manje izražene. Pokazano je da nema značajnih razlika u predviđenim profilima, bez obzira da li se više od 85% supstance rastvorilo za 15 minuta (veoma brzo rastvaranje) ili za 60 minuta.

Rezultati gastrointestinalnih simulacija u kombinaciji sa IVIVK su pokazali da su farmakopejski zahtevi za brzinu rastvaranja za tablete sa trenutnim oslobađanjem levotiroksina ograničavajući i da se kao biorelevantan može predložiti zahtev po kome se najmanje 85% lekovite supstance rastvori u roku od 60 minuta.



Farmakokinetički parametri predviđeni u virtuelnoj studiji kojom je simulirana dispozicija levotiroksina u većoj populaciji ispitanika su pokazali vrlo dobro slaganje sa *in vivo* podacima, kao i sa parametrima dobijenim u pojedinačnim simulacijama sprovedenim u cilju validacije modela, ukazujući na to da je resorpcioni model specifičan za levotiroksin adekvatno dizajniran. Rezultati virtuelnih studija u kojima su kao ulazni parametri korišćeni virtuelni profili koji simuliraju različite brzine rastvaranja ukazuju da se ne očekuje da bi se izvesne razlike u brzini rastvaranja levotiroksina *in vitro* pokazale značajnim *in vivo* i da je moguće predložiti biorelevantan zahtev za *in vitro* brzinu rastvaranja levotiroksina od >85% supstance rastvoreno u periodu od 60 minuta.

IV. Rezultati *in vitro* i *in silico* ispitivanja su pokazali da rastvorljivost i brzina rastvaranja levotiroksin-natrijuma nisu ograničavajući faktori za njegovu resorpciju. Na osnovu izračunate granične vrednosti doznog broja se može zaključiti da je rastvorljivost levotiroksin-natrijuma dovoljno visoka u svim delovima gastrointestinalnog trakta i da neće uticati na proces resorpcije. Ovakvi rezultati pokazuju da dodavanje surfaktanta u medijum za test *in vitro* brzine rastvaranja nije potrebno. Rezultati dobijeni primenom tehnike gastrointestinalne simulacije u kombinaciji sa IVIVK su pokazali da se i u slučaju manjih brzina rastvaranja levotiroksin-natrijuma iz tableta mogu očekivati koncentracije u plazmi koje su u skladu sa *in vivo* uočenim profilom. Na osnovu toga se fosfatni pufer pH 7.4, koji je prethodno propisivan od strane američke farmakopeje, može u potpunosti smatrati pogodnim za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja tableta sa trenutnim oslobađanjem levotiroksin-natrijuma.

Predložena metodologija koja uključuje tehnologiju gastrointestinalne simulacije i IVIVK ukazuje da postoji mogućnost primene *biowaiver* koncepta na generičke preparate koji sadrže levotiroksin. Međutim, ograničavajući faktori, kao što su neusaglašeni stavovi u pogledu klasifikacije levotiroksina u grupu lekova uske terapijske širine i varijabilni individualni odgovor na supstitucionu terapiju, koji po trenutno važećim smernicama ne podržavaju ovu *biowaiver* ekstenziju, kao i aktuelni regulatorni zahtevi za uporedno ispitivanje brzine rastvaranja lekovitih preparata sa trenutnim oslobađanjem koji sadrže visoko rastvorljive supstance, treba da budu dodatno ispitani i kritički procenjeni, da bi se utvrdila klinička relevantnost primenjenog

*in vitro/in silico* pristupa i mogućnost njegove primene u razvoju formulacije preparata i sprovođenju odgovarajućih postregistracionih izmena.

# LITERATURA

1. Cranefield PF. The discovery of cretinism. *Bulletin of the History of Medicine*. 1962; 36: 489-500.
2. Cranefield PF, Federn W. Paracelsus on goiter and cretinism. *Bulletin of the History of Medicine*. 1963; 37: 463-471.
3. Chatin A. Recherches sur l'iode des eaux douces; de la presence de ce corps dans les plantes at les animaux terrestes. *Comptes Rendus Hebdomadaires des S'eances de l'Academie des Sciences*. 1851; 31: 280-283.
4. Majkić-Singh N. Medicinska biohemija, drugo izdanje. Beograd: Društvo medicinskih biohemičara Srbije, 2006; 483-485.
5. Rang HP, Dale M, Ritter J, Flower J, Henderson G. Rang&Dale's Pharmacology, 7<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2011, 421-422.
6. Wiersinga W. Thyroid hormone replacement therapy. *Horm Res*. 2001; 56(Suppl 1): 74-81.
7. Baskin HJ, Cobin RH, Duick DS, Gharib H, Guttler RB, Kaplan MM, Segal RL. American Association of Clinical Endocrinologists. American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for Clinical Practice for the Evaluation and Treatment of Hyperthyroidism and Hypothyroidism. *Endocr Pract*. 2002; 8(6): 457-469.
8. USP 34. The United States Pharmacopoeia 34<sup>th</sup> ed. Rockville, MD: The United States Pharmacopoeial Convention, Inc, 2010.
9. Law D, Gerhardt A, Toh C *et al*. Physicochemical basis for the performance of oral solid dosage forms of levothyroxine sodium. *AAPS J*. 2009; 11(S2). Dostupno na: [http://www.aapsj.org/abstracts/AM\\_2009/AAPS2009-001265.PDF](http://www.aapsj.org/abstracts/AM_2009/AAPS2009-001265.PDF) [poslednji pristup 08.04.2012].
10. Hueston W. Treatment of Hypothyroidism. *Am Fam Physician*. 2001; 64(10): 1717-1725.
11. Bensor IM, Olmos RD, Lotufo PA. Hypothyroidism in the elderly: diagnosis and management. *Clin Interv Aging*. 2012; 7: 97-111.
12. Synthroid Clinical Pharmacology. Dostupno na: <http://www.rxlist.com/synthroid-drug.htm> [poslednji pristup 20.03.2012].

13. Pierres C, Gaugain-Hamidi A. Concentrated Liquid Thyroid Hormone Composition, US Patent application number: 20090270507. Dostupno na: <http://www.faqs.org/patents/app/20090270507> [poslednji pristup 13.05.2012].
14. The DrugBank database. Dostupno na: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00451> [poslednji pristup 04.06.2011].
15. Kasim NA, Whitehouse M, Ramachandran C *et al.* Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Mol Pharm.* 2004; 12(1): 85-96.
16. ADME/ToxWeb.  
Dostupno na: <http://pharmaalgorithms.com/webboxes/index.php> [poslednji pristup 06.12.2011].
17. Pabla D, Akhlaghi F, Zia H. Intestinal permeability enhancement of levothyroxine sodium by straight chain fatty acids studied in MDCK epithelial cell line. *Eur J Pharm Sci.* 2010; 40(5): 466-472.
18. Pabla D, Akhlaghi F, Zia H. A comparative pH-dissolution profile study of selected commercial levothyroxine products using inductively coupled plasma mass spectrometry. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009; 72(1): 105-110.
19. Budavari S. The Merck Index. 13<sup>th</sup> ed. Whitehouse Station, NJ: Merck&Co; 2001; 1678.
20. Won CM. Kinetics of degradation of levothyroxine in aqueous solution and in solid state. *Pharm Res.* 1992; 9(1): 131-137.
21. Lindenberg M, Kopp S, Dressman JB. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the Biopharmaceutics Classification System. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004; 58(2): 265-278.
22. Jamzad S, Fassihi R. Dissolution rate of BCS Class II drugs: Influence of pH, surfactants, and sink condition on discriminatory power of dissolution testing. AAPS Annual Meeting and Exposition, November 2005.
23. FDA/CDER Guidance for industry: Levothyroxine Sodium Tablets-*In Vivo* Pharmacokinetic and Bioavailability Studies and *In Vitro* Dissolution Testing, 2000.

24. USP 24. The United States Pharmacopoeia 24<sup>th</sup> ed. Rockville, MD: The United States Pharmacopoeial Convention, Inc, 2000; 969.
25. USP 25, The United States Pharmacopoeia 25<sup>th</sup> ed. Rockville, MD: The United States Pharmacopoeial Convention, Inc; 2002; 1002.
26. USP 30, The United States Pharmacopoeia 30<sup>th</sup> ed. Rockville, MD: The United States Pharmacopoeial Convention, Inc; 2006; 2470.
27. Volpato NM, Silva RL, Brito AP, Gonçalves JC, Vaisman M, Noël F. Multiple level C *in vitro/in vivo* correlation of dissolution profiles of two l-thyroxine tablets with pharmacokinetics data obtained from patients treated for hypothyroidism. *Eur J Pharm Sci.* 2004; 21(5): 655-660.
28. Lilja JJ, Laitinen K, Neuvonen PJ. Effects of grapefruit juice on the absorption of levothyroxine. *Br J Clin Pharmacol.* 2005; 60(3): 337-341.
29. Hays MT. Localization of human thyroxine absorption. *Thyroid.* 1991; 1(3): 241-248.
30. Bolton S. Bioequivalence studies for levothyroxine. *AAPS J.* 2005; 7(1): E47-E53.
31. Green WL. New questions regarding bioequivalence of levothyroxine preparations: a clinician's response. *AAPS J.* 2005; 7(1): E54-E58.
32. Hennessey JV. Levothyroxine dosage and the limitations of current bioequivalence standards. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2006; 2(9): 474-475.
33. Blakesley V, Awni W, Locke C, Ludden T, Granneman GR, Braverman LE. Are bioequivalence studies of levothyroxine sodium formulations in euthyroid volunteers reliable? *Thyroid.* 2004; 14(3): 191-200.
34. Blakesley VA. Current methodology to assess bioequivalence of levothyroxine sodium products is inadequate. *AAPS J.* 2005; 7(1): E42-E46.
35. EMA/CPMP Guideline on the Investigation of Bioequivalence. CPMP/EWP/QWP/1401/98. Rev. 1, 2010.
36. Sawin CT, Susks MI, London M, Ranganathan C, Larsen PR. Oral thyroxine: variation in biological action and tablet content. *Ann Intern Med.* 1984; 100(5): 641-645.

37. Dong BJ, Brown CH. Hypothyroidism resulting from test levothyroxine failure. *J Am Board Fam Pract.* 1991; 4(3): 167-170.
38. Copeland PM. Two cases of therapeutic failure associated with levothyroxine levothyroxine brand interchange. *Ann Pharmacother.* 1995; 29(5): 482-485.
39. Levothyroxine Sodium Product Information. Dostupno na: <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm161257.htm> [poslednji pristup 24.06.2012].
40. Ritschel WA, Kearns GL. Handbook of basic pharmacokinetics: Including clinical applications, 6<sup>th</sup> edition. Washington DC: American Pharmaceutical Association, 2004.
41. Shram MJ, Quinn AM, Chen N, Faulknor J, Luong D, Sellers EM, Endrenyi L. Differences in the *in vitro* and *in vivo* pharmacokinetic profiles of once-daily modified-release methylphenidate formulations in Canada: examination of current bioequivalence criteria. *Clin Ther.* 2012; 34(5): 1170-1181.
42. McGilveray IJ. Bioequivalence studies of drugs prescribed mainly for women. *J Popul Ther Clin Pharmacol.* 2011; 18(3): e516-e522.
43. Arnold ME. Implications of differences in bioanalytical regulations between Canada, USA and South America. *Bioanalysis.* 2011; 3(3): 253-258.
44. Viswanathan CT. Incurred sample reanalysis: a global transformation. *Bioanalysis.* 2011; 3(23): 2601-2602.
45. Karalis V, Symillides M, Macheras P. On the leveling-off properties of the new bioequivalence limits for highly variable drugs of the EMA guideline. *Eur J Pharm Sci.* 2011; 44(4): 497-505.
46. Apparaju SK and Nallani SC. Pharmacokinetics: Basics of drug absorption from a biopharmaceutical perspective. In: Chilukuri DM, Sunkara G, Young D, editors. Pharmaceutical product development: *in vitro-in vivo* correlation. New York: Informa Healthcare USA, Inc, 2007.
47. Dressman JB, Amidon GL, Reppas C, Shah VP. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. *Pharm Res.* 1998; 15(1): 11-22.
48. Warren JB. Generics, Chemisimilars and Biosimilars: is clinical testing fit for purpose? *Br J Clin Pharmacol.* 2013; 75(1): 7-14.

49. Chen ML, Shah VP, Crommelin DJ *et al.* Harmonization of regulatory approaches for evaluating therapeutic equivalence and interchangeability of multisource drug products: workshop summary report. *Eur J Pharm Sci.* 2011; 44(4): 506-513.
50. FDA /Abbreviated New Drug Application (ANDA): Generics.  
Dostupno na:  
<http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/ApprovalApplications/AbbreviatedNewDrugApplicationANDAGenerics/default.htm> [poslednji pristup 15.05.2012].
51. Frank R. The Ongoing Regulation of Generic Drugs. *N Engl J Med.* 2007; 357(20): 1993-1996.
52. FDA Drug products: bioequivalence requirements and *in vivo* bioavailability. *Federal Register* III, 42: 1624–1653, 1977.
53. FDA/CDER Guidance for industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products-General Considerations, 2003.
54. EMA/CPMP Note for guidance on good clinical practice. CPMP/ICH/135/95, 2002.
55. World Medical Association's Declaration of Helsinki-Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects.  
Dostupno na: <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3> [poslednji pristup 01.05.2012].
56. García-Arieta A, Morales-Alcelay S, Herranz M, de la Torre-Alvarado JM, Blázquez-Pérez A. Investigation on the need of multiple dose bioequivalence studies for prolonged-release generic products. *Int J Pharm.* 2012; 423(2): 321-325.
57. Byakika-Tusiime J, Chinn LW, Oyugi JH, Obua C, Bangsberg DR, Kroetz DL. Steady state bioequivalence of generic and innovator formulations of stavudine, lamivudine, and nevirapine in HIV-infected Ugandan adults. *PLoS One.* 2008; 3(12): e3981.
58. Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring No 13. Paris, France: ENV, JM, MONO, 2002.



59. FDA/CDER Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, 2001.
60. EMA/CHMP Guideline on Bioanalytical Method Validation. EMA/CHMP/EWP/192217/2009, 2011.
61. Rani S, Pargal A. Bioequivalence: An overview of statistical concepts. *Indian J Pharmacol.* 2004; 36(4): 209-216.
62. Tothfalusi L, Endrenyi L. Sample sizes for designing bioequivalence studies for highly variable drugs. *J Pharm Pharm Sci.* 2012; 15(1): 73-84.
63. Karalis V, Symillides M, Macheras P. Bioequivalence of highly variable drugs: a comparison of the newly proposed regulatory approaches by FDA and EMA. *Pharm Res.* 2012; 29(4): 1066-1077.
64. Cao GY, Li KX, Jin PF, Yue XY, Yang C, Hu X. Comparative bioavailability of ferrous succinate tablet formulations without correction for baseline circadian changes in iron concentration in healthy Chinese male subjects: a single-dose, randomized, 2-period crossover study. *Clin Ther.* 2011; 33(12): 2054-2059.
65. Dissanayake S. Assessing the bioequivalence of analogues of endogenous substances ('endogenous drugs'): considerations to optimize study design. *Br J Clin Pharmacol.* 2010; 69(3): 238-244.
66. Chik Z, Johnston A, Tucker AT, Kirby K, Alam CA. Correcting endogenous concentrations of testosterone influences bioequivalence and shows the superiority of TDS(R)-testosterone versus Androgel(R). *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2009; 47(4): 262-268.
67. FDA/CDER Guidance for industry: Potassium Chloride Modified-Release Tablets and Capsules: *In Vivo* Bioequivalence and *In Vitro* Dissolution Testing, 2005.
68. Wu PC, Tsai MJ, Huang YB, Chang JS, Tsai YH. *In vitro* and *in vivo* evaluation of potassium chloride sustained release formulation prepared with saturated polyglycolyed glycerides matrices. *Int J Pharm.* 2002; 243(1-2): 119-124.
69. Wu PC, Huang YB, Chang JS, Tsai MJ, Tsai YH. Design and evaluation of sustained release microspheres of potassium chloride prepared by Eudragit. *Eur J Pharm Sci.* 2003; 19(2-3): 115-122.

70. Spireas S, Sadu S, Grover R. *In vitro* release evaluation of hydrocortisone liquisolid tablets. *J Pharm Sci.* 1998; 87(7): 867-872.
71. Reis CP, Ribeiro AJ, Hounq S, Veiga F, Neufeld RJ. Nanoparticulate delivery system for insulin: design, characterization and *in vitro/in vivo* bioactivity. *Eur J Pharm Sci.* 2007; 30(5): 392-397.
72. Amidon GL, Lennernas H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharm Res.* 1995; 12(3): 413-420.
73. Martinez MN, Amidon GL. A mechanistic approach to understanding the effects affecting drug absorption: a review of fundamentals. *J Clin Pharmacol.* 2002; 42(6): 620-643.
74. Cook J, Addicks W, Wu YH. Application of the biopharmaceutical classification system in clinical drug development-an industrial view. *AAPS J.* 2008; 10(2): 306-310.
75. Dickinson P, Lee W, Stott P *et al.* Clinical relevance of dissolution testing in quality by design. *The AAPS J.* 2008; 10(2): 280-290.
76. Yalkowsky SH, Valvani SC. Solubility and partitioning I: solubility of nonelectrolytes in water. *J Pharm Sci.* 1980; 69(8): 912-922.
77. Jain N, Yalkowsky SH. Estimation of the aqueous solubility I: application to organic non-electrolytes. *J Pharm Sci.* 2001; 90(2): 234-252.
78. Johnson KC, Swindell AC. Guidance in the setting of drug particle size specification to minimize variability in absorption. *Pharm Res.* 1996; 13(12): 1795-1798.
79. Emami J. *In vitro-in vivo* correlation: from theory to applications. *J Pharm Pharmaceut Sci.* 2006; 9(2): 31-51.
80. FDA/CDER Guidance for industry: Waiver of *In Vivo* Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System, 2000.
81. Polli JE, Cook JA, Davit BM *et al.* Summary workshop report: facilitating oral product development and reducing regulatory burden through novel approaches to assess bioavailability/bioequivalence. *AAPS J.* 2012; 14(3): 627-638.

82. Yu Lx, Amidon GL, Polli JE *et al.* Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. *Pharm Res.* 2002; 19(7): 921-925.
83. Polli JE, Yu LX, Cook JA *et al.* Summary workshop report: Biopharmaceutics classification system-implementation challenges and extension opportunities. *J Pharm Sci.* 2004; 93(6): 1375-1381.
84. Kovacević I, Parojčić J, Tubić-Grozdanis M, Langguth P. An investigation into the importance of "very rapid dissolution" criteria for drug bioequivalence demonstration using gastrointestinal simulation technology. *AAPS J.* 2009; 11(2): 381-384.
85. Varma MV, Gardner I, Steyn SJ *et al.* pH-dependent solubility and permeability criteria for provisional biopharmaceutics classification (BCS and BDDCS) in early drug discovery. *Mol Pharm.* 2012; 9(5): 1199-1212.
86. Amidon KS, Langguth P, Lennernäs H, Yu L, Amidon GL. Bioequivalence of oral products and the biopharmaceutics classification system: science, regulation, and public policy. *Clin Pharmacol Ther.* 2011; 90(3): 467-470.
87. Yazdanian M, Briggs K, Jankovsky C, Hawi A. The "high solubility" definition of the current FDA guidance on Biopharmaceutical Classification system may be too strict for acidic drugs. *Pharm Res.* 2004; 21(2): 293-299.
88. Kataoka M, Masaoka Y, Yamazaki Y, Sakane T, Sezaki H, Yamashita S: *In vitro* system to evaluate oral absorption of poorly water-soluble drugs: simultaneous analysis on dissolution and permeation of drugs. *Pharm Res.* 2003; 20(10): 1674-1680.
89. Sugawara M, Kadomura S, He X, Takekuma Y, Kohri N, Miyazaki K: The use of an *in vitro* dissolution and absorption system to evaluate oral absorption of two weak bases in pH-independent controlled-release formulations. *Eur J Pharm Sci.* 2005; 26(1): 1-8.
90. Alsenz J, Kansy M. High throughput solubility measurement in drug discovery and development. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007; 59(7): 546-567.
91. Dressman JB, Vertzoni M, Goumas K, Reppas C. Estimating drug solubility in the gastrointestinal tract. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007; 59(7): 591-602.

92. Yu LX, Carlin AS, Amidon GL, Hussain AS. Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. *Int J Pharm.* 2004; 270(1-2): 221-227.
93. Li S, He H, Parthiban LJ, Yin H, Serajuddin AT. IV-IVC considerations in the development of immediate-release oral dosage form. *J Pharm Sci.* 2005; 94(7): 1396-1417.
94. Fleisher D. Biological transport phenomena in the gastrointestinal tract: Cellular mechanisms. In: Amidon GL, Lee PI, Topp EM, editors. *Transport processes in pharmaceutical systems.* New York: Marcel Dekker, Inc, 2000.
95. Lipka E, Amidon GL. Setting bioequivalence requirements for drug development based on preclinical data: optimizing oral drug delivery systems. *J Control Release.* 1999; 62(1-2): 41-49.
96. Volpe DA. Drug-permeability and transporter assays in Caco-2 and MDCK cell lines. *Future Med Chem.* 2011; 3(16): 2063-2077.
97. Watanabe E, Takahashi M, Hayashi M. A possibility to predict the absorbability of poorly water-soluble drugs in humans based on rat intestinal permeability assessed by an *in vitro* chamber method. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004; 58(3): 659-665.
98. Nygren A, Thorén A, Ricksten SE. Effects of norepinephrine alone and norepinephrine plus dopamine on human intestinal mucosal perfusion. *Intensive Care Med.* 2003; 29(8): 1322-1328.
99. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feenly PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997; 23: 3-25.
100. Kokate A, Li X, Williams PJ, Singh P, Jasti BR. *In silico* prediction of drug permeability across buccal mucosa. *Pharm Res.* 2009; 26(5): 1130-1139.
101. Balimane PV, Han YH, Chong S. Current industrial practices of assessing permeability and P-glycoprotein interaction. *AAPS J.* 2006; 8(1): E1-E13.
102. Dahan A, Sabit H, Amidon GL. Multiple efflux pumps are involved in the transepithelial transport of colchicine: combined effect of p-glycoprotein and multidrug resistance- associated protein 2 leads to decreased intestinal

- absorption throughout the entire small intestine. *Drug Metab Dispos.* 2009; 37(10): 2028-2036.
103. Shah VP. Dissolution: a quality control test vs a bioequivalence test. *Dissolution Technologies.* 2001; 8(4): 6-7.
  104. Klein S. The use of biorelevant dissolution media to forecast the *in vivo* performance of a drug. *AAPS J.* 2010; 12(3): 397-406.
  105. Anand O, Yu LX, Conner DP, Davit BM. Dissolution testing for generic drugs: an FDA perspective. *AAPS J.* 2011; 13(3): 328-335.
  106. USP 18. The United States Pharmacopoeia 18<sup>th</sup> ed. Rockville, MD: The United States Pharmacopoeial Convention, Inc, 1970.
  107. FDA/CDER Guidance for industry: Oral Extended (controlled) Release Dosage Forms *In Vivo* Bioequivalence and *In Vitro* Dissolution Testing, 1993.
  108. FDA/CDER Guidance for industry: Immediate-Release Solid Dosage Forms: Scale-Up and Postapproval Changes (SUPAC-IR): Chemistry, Manufacturing and Controls, *In Vitro* Dissolution Testing and *In Vivo* Bioequivalence Test Documentation, 1995.
  109. FDA/CDER Guidance for industry: Dissolution Testing of Immediate-release Solid Oral Dosage Forms, 1997.
  110. FDA/CDER Guidance for industry: Modified-Release Solid Dosage Forms: Scale-Up and Postapproval Changes (SUPAC-MR): Chemistry, Manufacturing and Controls, *In Vitro* Dissolution Testing and *In Vivo* Bioequivalence Test Documentation, 1997.
  111. FDA/CDER Guidance for Industry: Extended-Release Oral dosage Forms: Development, Evaluation and Application of *In Vitro/In Vivo* Correlation, 1997.
  112. EMA/CPMP Note for Guidance Specifications: Test procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical substances. CPMP/ICH/367/96.2000, 2000.
  113. EMA Draft Guidance on Quality of Oral Modified-Release Products. EMA/492713/2012, 2012.
  114. Ramirez E, Laosa O, Guerra P *et al.* Acceptability and characteristics of 124 human bioequivalence studies with active substances classified according to

- the Biopharmaceutic Classification System. *Br J Clin Pharmacol*. 2010; 70(5): 694-702.
115. Dokoumetzidis A, Macheras P. A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the biopharmaceutics classification system. *Int J Pharm*. 2006; 321(1-2): 1-11.
  116. Grbić S, Parojčić J, Ibrić S, Đurić Z. *In vitro-in vivo* correlation for gliclazide immediate-release tablets based on mechanistic absorption simulation. *AAPS PharmSciTech*. 2011; 12(1): 165-171.
  117. Okumu A, DiMaso M, Löbenberg R. Dynamic dissolution testing to establish *in vitro/in vivo* correlations for montelukast sodium, a poorly soluble drug. *Pharm Res*. 2008; 25(12): 2778-2785.
  118. Rinaki E, Dokoumetzidis A, Valsami G, Macheras P. Identification of biowaivers among class II drugs: theoretical justification and practical examples. *Pharm Res*. 2004; 21(9): 1567-1572.
  119. Kortejarvi H, Urtti A, Yliperttula M. Pharmacokinetic simulation of biowaiver criteria: the effects of gastric emptying, dissolution, absorption and elimination rates. *Eur J Pharm Sci*. 2007; 30(2): 155-166.
  120. Blume HH, Schug BS. The biopharmaceutics classification system (BCS): Class III drugs-better candidates for BA/BE waiver? *Eur J Pharm Sci*. 1999; 9(2): 117-121.
  121. Cheng CL, Yu LX, Lee HL, Yang CY, Lue CS, Chou CH. Biowaiver extension potential to BCS class III high solubility-low permeability drugs: bridging evidence for metformin immediate-release tablets. *Eur J Pharm Sci*. 2004; 22(4): 297-304.
  122. Kortejarvi H, Yliperttula M, Dressman JB, Junginger HE, Midha KK, Shah VP, Barends DM. Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: ranitidine hydrochloride. *J Pharm Sci*. 2005; 94(8): 1617-1625.
  123. Alvarez C, Núñez I, Torrado JJ, Gordon J, Potthast H, García-Arieta A. Investigation on the possibility of biowaivers for ibuprofen. *J Pharm Sci*. 2011; 100(6): 2343-2349.

124. WHO Multisource (generic) pharmaceutical products: Guidelines on registration requirements to establish interchangeability. WHO Technical Report Series No. 937, Annex 7, 2006.
125. [http://www.fip.org/bcs\\_biowaiver](http://www.fip.org/bcs_biowaiver) [poslednji pristup 01.05.2012].
126. WHO Multisource (generic) pharmaceutical products: Guidelines on registration requirements to establish interchangeability. WHO Technical Report Series No. 937, Annex 8, 2006.
127. Wagner JG, Nelson E. Percent absorbed time plots derived from blood level and/or urinary excretion data. *J Pharm Sci.* 1963; 52: 610-611.
128. Riegelman S, Loo JCK. New method for calculating the intrinsic absorption rate of drugs. 1968; *J Pharm Sci.* 57: 918-928.
129. Huang W, Lee SL, Yu LX. Mechanistic approaches to predicting oral drug absorption. *The AAPS J.* 2009; 11(2): 217-224.
130. Okumu A, DiMaso M, Lobenberg R. Computer simulations using GastroPlus<sup>TM</sup> to justify a biowaiver for etoricoxib solid oral drug products. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009; 72(1): 91-98.
131. Jamei M, Turner D, Yang J *et al.* Population-based mechanistic prediction of oral drug absorption. *AAPS J.* 2009; 11(2): 225-237.
132. Jacobs MH. Some aspects of cell permeability to weak electrolytes. Cold Spring Harbor Symp. *Quant Biol.* 1940; 8: 30-39.
133. Hogben CAM, Tocco DJ, Brodie BB, Schanker LS. On the mechanism of intestinal absorption of drugs. *J Pharmacol Exp Ther.* 1959; 125(4): 275-282.
134. Suzuki A, Higuchi WI, Ho NF. Theoretical model studies of drug absorption and transport in the gastrointestinal tract I. *J Pharm Sci.* 1970; 59(5): 644-651.
135. Suzuki A, Higuchi WI, Ho NF. Theoretical model studies of drug absorption and transport in the gastrointestinal tract II. *J Pharm Sci.* 1970; 59(5): 651-659.
136. Ho NF, Higuchi WI. Quantitative interpretation of *in vivo* buccal absorption of n-alkanoic acids by the physical model approach, *J Pharm Sci.* 1971; 60(4): 537-541.
137. Dressman JB, Fleisher D, Amidon GL. Physicochemical model for dose-dependent drug absorption. *J Pharm Sci.* 1984; 73(9): 1274-1279.

138. Agoram B, Woltosz WS, Bolger MB. Predicting the impact of physiological and biochemical processes on oral drug bioavailability. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001; 50 Suppl 1: S41-S67.
139. Yu LX, Crison JR, Amidon GL. Compartmental transit and dispersion model analysis of small intestinal transit flow in humans. *Int J Pharm.* 1996; 140: 111-118.
140. GastroPlus™ User Manual version 6.1. Simulations Plus, Inc., Lancaster, CA, USA, November 2009.
141. Bolger MB, Lukacova V, Woltosz WS. Simulations of the nonlinear dose dependence for substrates of influx and efflux transporters in the human intestine. *AAPS J.* 2009; 11(2): 353-363.
142. Sinha VK, Snoeys J, Osselaer NV, Peer AV, Mackie C, Heald D. From preclinical to human--prediction of oral absorption and drug-drug interaction potential using physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling approach in an industrial setting: a workflow by using case example. *Biopharm Drug Dispos.* 2012; 33(2): 111-121.
143. Abuasal BS, Bolger MB, Walker DK, Kaddoumi A. *In silico* modeling for the nonlinear absorption kinetics of UK-343,664: a P-gp and CYP3A4 substrate. *Mol Pharm.* 2012; 9(3): 492-504.
144. Parrott N, Davies B, Hoffmann G, Koerner A, Lave T, Prinssen E, Theogaraj E, Singer T. Development of a physiologically based model for oseltamivir and simulation of pharmacokinetics in neonates and infants. *Clin Pharmacokinet.* 2011; 50(9): 613-623.
145. Dunne A, O'Hare T, Devane J. Level A *in vivo-in vitro* correlation: nonlinear models and statistical methodology. *J Pharm Sci.* 1997; 86(11): 1245-1249.
146. Venkata Ramana S, Uppoor M. Regulatory perspectives on *in vitro* (dissolution)/*in vivo* (bioavailability) correlations. *J Control Release.* 2001; 72(1-3): 127-132.
147. Jantratid E, De Maio V, Ronda E, Mattavelli V, Vertzoni M, Dressman JB. Application of biorelevant dissolution tests to the prediction of *in vivo* performance of diclofenac sodium from an oral modified-release pellet dosage form. *Eur J Pharm Sci.* 2009; 37(3-4): 434-441.



148. Souliman S, Blanquet S, Beyssac E, Cardot JM. A level A *in vitro/in vivo* correlation in fasted and fed states using different methods: applied to solid immediate release oral dosage form. *Eur J Pharm Sci.* 2006; 27(1): 72-79.
149. Turner S, Federici C, Hite M, Fassihi R. Formulation development and human *in vitro-in vivo* correlation for a novel, monolithic controlled-release matrix system of high load and highly water-soluble drug niacin. *Drug Dev Ind Pharm.* 2004; 30(8): 797-807.
150. Park JS, Shim JY, Park JS *et al.* Formulation variation and *in vitro-in vivo* correlation for a rapidly swellable three-layered tablet of tamsulosin HCl. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2011; 59(5): 529-535.
151. Kuksal A, Tiwary AK, Jain NK, Jain S. Formulation and *in vitro, in vivo* evaluation of extended- release matrix tablet of zidovudine: influence of combination of hydrophilic and hydrophobic matrix formers. *AAPS PharmSciTech.* 2006; 7(1): E1.
152. Dunne A. Approaches to developing *in vitro-in vivo* correlation models. In: Chilukuri DM, Sunkara G, Young D, editors. Pharmaceutical product development: *in vitro-in vivo* correlation. New York: Informa Healthcare USA, Inc, 2007.
153. Dokoumetzidis A, Macheras P. IVIVC of controlled release formulations: physiological-dynamical reasons for their failure. *J Control Release.* 2008; 129(2): 76-78.
154. Buchwald P. Direct, differential-equation-based *in vitro-in vivo* correlation (IVIVC) method. *J Pharm Pharmacol.* 2003; 55(4): 495-504.
155. Chiba M, Ishii Y, Sugiyama Y. Prediction of hepatic clearance in human from *in vitro* data for successful drug development. *AAPS J.* 2009; 11(2): 262-276.
156. Gómez-Lechón MJ, Castell JV, Donato MT. Hepatocytes-the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: *in vitro* variability as a reflection of *in vivo*. *Chem Biol Interact.* 2007; 168(1): 30-50.
157. Veng-Pedersen P, Gobburu JVS, Meye MC, Straughn AB. Carbamazepine level-A *in vitro-in vivo* correlation (IVIVC): a scaled convolution based predictive approach. *Biopharm Drug Dispos.* 2000; 21(1): 1-6.

158. Corrigan OI, Devline Y, Butler J. Influence of dissolution medium buffer composition on ketoprofen release from ER products and *in vitro-in vivo* correlation. *Int J Pharm.* 2003; 254(2): 147-154.
159. Jantravid E, Prakongpan S, Amidon GL, Dressman JB. Feasibility of biowaiver extension to Biopharmaceutics Classification System class III drug products cimetidine. *Clin Pharmacokinet.* 2006; 45(4): 385-399.
160. Homšek I, Parojčić J, Dačević M, Petrović Lj, Jovanović D. Justification of metformin hydrochloride biowaiver criteria based on bioequivalence study. *Arzneimittelforschung.* 2010; 60(9): 553-559.
161. Young D, Chilukuri D, Becker R, Bigora S, Farrell C, Shepard T. Approaches to developing a Level-A IVIVC for injectable dosage forms. *AAPS PharmSci.* 2002; 4(4): M1357.
162. Mitra A, Wu Y. Use of *In Vitro-In Vivo* Correlation (IVIVC) to facilitate the development of polymer-based controlled release injectable formulation. *Recent Pat Drug Deliv Formul.* 2010; 4(2): 94-104.
163. European Pharmacopoeia 7<sup>th</sup> ed. Strasbourg: Council of Europe, 2011.
164. Moore JW, Flanner HH. Mathematical comparison of curves with an emphasis on *in vitro* release profiles. *Pharm Tech.* 1996; 20(6): 64-74.
165. Pravilnik o sadržaju zahteva, odnosno dokumentacije za odobrenje kliničkog ispitivanja leka i medicinskog sredstva, kao i način sprovođenja kliničkog ispitivanja leka i medicinskog sredstva.  
Dostupno na:  
[http://www.alims.gov.rs/download/regulativa/Pravilnici/Pravilnik%20o%20klinickom%20ispitivanju/pravilnik%20klinicka\\_2011.pdf](http://www.alims.gov.rs/download/regulativa/Pravilnici/Pravilnik%20o%20klinickom%20ispitivanju/pravilnik%20klinicka_2011.pdf)  
[poslednji pristup 03.03.2012].
166. Sweetman S, ed. Martindale: The Extra Pharmacopoeia, 36<sup>th</sup> ed. London: The Pharmaceutical Press, 2009; 2171-2174.
167. McCarthy LG, Bradley G, Sexton JC, Corrigan OI, Healy AM. Computational fluid dynamics modeling of the paddle dissolution apparatus: agitation rate, mixing patterns, and fluid velocities. *AAPS PharmSciTech.* 2004; 5(2): e31.

168. McCarthy LG, Kosiol C, Healy AM, Bradley G, Sexton JC, Corrigan OI. Simulating the hydrodynamic conditions in the United States Pharmacopeia paddle dissolution apparatus. *AAPS PharmSciTech*. 2003; 4(2): E22.
169. D'Arcy DM, Corrigan OI, Healy AM. Evaluation of hydrodynamics in the basket dissolution apparatus using computational fluid dynamics-dissolution rate implications. *Eur J Pharm Sci*. 2006; 27(2-3): 259-267.
170. Qureshi SA, Shabnam J. Cause of high variability in drug dissolution testing and its impact on setting tolerances. *Eur J Pharm Sci*. 2001; 12(3): 271-276.
171. Zhao N, Augsburger LL. Functionality comparison of 3 classes of superdisintegrants in promoting aspirin tablet disintegration and dissolution. *AAPS PharmSciTech*. 2005; 6(4): E634-E640.
172. Carmella C, Ferrari F, Bonferroni MC, Ronchi M. Disintegrants in solid dosage forms. *Drug Dev Ind Pharm*. 1990; 16(17): 2561-2577.
173. Gordon MS, Chatterjee B, Chowhan ZT. Effect of the mode of croscarmellose sodium incorporation on tablet dissolution and friability. *J Pharm Sci*. 1990; 79(1): 43-47.
174. Flores-Murrieta FJ, Toledo A, del Carmen Carrasco-Portugal M, Reyes-García G, Rodríguez-Silverio J, Medina-Santillán R, Herrera JE. Comparative bioavailability of two oral formulations of ranitidine. *Biopharm Drug Dispos*. 2006; 27(1): 23-27.
175. Koytchev R, Lauschner R. Bioequivalence study of levothyroxine tablets compared to reference tablets and an oral solution. *Arzneimittelforschung*. 2004; 54(10): 680-684.
176. Grussendorf M, Vaupel R, Wegscheider K. Bioequivalence of L-thyroxine tablets and a liquid L-thyroxine solution in the treatment of hypothyroid patients. *Med Klin (Munich)*. 2004; 99(11): 639-644.
177. Yannovits N, Zintzaras E, Pouli A *et al*. A bioequivalence study of levothyroxine tablets versus an oral levothyroxine solution in healthy volunteers. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2006; 31(2): 73-78.
178. Leggio GM, Incognito T, Privitera G, Marano MR, Drago F. Comparative bioavailability of different formulations of levothyroxine and liothyronine in healthy volunteers. *J Endocrinol Invest*. 2006; 29(11): RC35-38.

179. Walter-Sack I, Clanget C, Ding R *et al.* Assessment of levothyroxine sodium bioavailability: recommendations for an improved methodology based on the pooled analysis of eight identically designed trials with 396 drug exposures. *Clin Pharmacokinet.* 2004; 43(14): 1037-1053.
180. Shah VP, Tsong Y, Sathe P, Liu JP. *In vitro* dissolution profile comparison-statistics and analysis of the similarity factor,  $f_2$ . *Pharm Res.* 1998; 15(6): 889-896.
181. Di Girolamo G, Keller GA, de Los Santos AR, Schere D, Gonzalez CD. Bioequivalence of two levothyroxine tablet formulations without and with mathematical adjustment for basal thyroxine levels in healthy Argentinian volunteers: a single-dose, randomized, open-label, crossover study. *Clin Ther.* 2008; 30(11): 2015-2023.
182. Gottwald R, Lorkowski G, Petersen G, Schnitzler M, Lücker PW. Bioequivalence of two commercially available levothyroxine-Na preparations in athyretic patients. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 1994; 16(9): 645-650.
183. Health Canada. Expert Advisory Committee on Bioavailability. Record of Proceedings. April 16, 2003.  
Dostupno na: [http://www.hc-sc.gc.ca/hpfbdgpsa/tpd-dpt/2003-04-16\\_e.html](http://www.hc-sc.gc.ca/hpfbdgpsa/tpd-dpt/2003-04-16_e.html) [poslednji pristup 24.04.2012].
184. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations. Title 21, Part 320: Bioavailability and Bioequivalence Requirements. Section 320.33(c). 2003.  
Dostupno na: <http://www.accessdata.fda.gov> [poslednji pristup 24.04.2012].
185. Baek IH, Lee BY, Kang W, Kwon KI. Comparison of average, scaled average, and population bioequivalence methods for assessment of highly variable drugs: an experience with doxifluridine in beagle dogs. *Eur J Pharm Sci.* 2010; 39(1-3): 175-180.
186. Haidar SH, Makhoulouf F, Schuirmann DJ, Hyslop T, Davit B, Conner D, Yu LX. Evaluation of a scaling approach for the bioequivalence of highly variable drugs. *AAPS J.* 2008; 10(3): 450-454.

187. Cerutti R, Rivolta G, Cavalieri L *et al.* Bioequivalence of levothyroxine tablets administered to a target population in steady state. *Pharmacol Res.* 1999; 39(3): 193-201.

## **OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE**

### **Radovi objavljeni u međunarodnim časopisima:**

1. Kocic I, Homsek I, Dacevic M, Parojcic J, Miljkovic B. An investigation into the influence of experimental conditions on *in vitro* drug release from immediate-release tablets of levothyroxine sodium and its relation to oral bioavailability. *AAPS PharmSciTech* 2011; 12(3): 938-948.
2. Kocic I, Homsek I, Dacevic M, Grbic S, Parojcic J, Vucicevic K, Prostran M, Miljkovic B. A case study on the *in silico* absorption simulations of levothyroxine sodium immediate-release tablets. *Biopharm Drug Dispos* 2012; 33(3): 146-159.

### **Rad saopšten na međunarodnom skupu štampan u celini:**

1. Kocic I, Homsek I, Dacevic M, Grbic S, Parojcic J, Miljkovic B. Application of gastrointestinal simulation for development of *in vitro-in vivo* correlation for levothyroxine sodium immediate-release tablets. 4<sup>th</sup> BBBB – Bled International Conference on Pharmaceutical Sciences, Bled, Slovenia, September 29<sup>th</sup> – October 1<sup>st</sup>, 2011. *Eur J Pharm Sci* 2011; 44 (Suppl 1): 112-113.

### **Radovi saopšteni na međunarodnim skupovima štampani u izvodu:**

1. Kocic I, Homsek I, Dacevic M. Application of experimental design for screening study of dissolution test conditions: levothyroxine sodium immediate-release tablets. 8<sup>th</sup> Central European Symposium on Pharmaceutical Technology and Biotechnology, Graz, Austria, September 15<sup>th</sup> – 18<sup>th</sup>, 2010. *Sci Pharm* 2010; 78: 701 (PPAT12).
2. Kocic I, Homsek I, Dacevic M, Parojcic J, Vucicevic K, Prostran M, Miljkovic B. Development of level A *in vitro-in vivo* correlation for levothyroxine sodium Tablets. 8<sup>th</sup> World Meeting on Pharmaceutics Biopharmaceutics, Pharmaceutical Technology, Istanbul, Turkey, March 19<sup>th</sup> – 22<sup>th</sup>, 2012. P-212.

3. Kocić I, Homšek I, Dacević M, Prostran M, Miljković B. Bioequivalence of two levothyroxine products without and with adjustment for endogenous level. 9<sup>th</sup> Central European Symposium on Pharmaceutical Technology and Biotechnology, Dubrovnik, Croatia, September 20<sup>th</sup> – 22<sup>th</sup>, 2012. PP110.

**Radovi saopšteni na nacionalnim skupovima štampani u izvodu:**

1. Kocić I, Homšek I, Dačević M, Miljković B. Višestruka *in vitro/in vivo* korelacija nivoa C: primer levotiroksin-natrijum tablete sa trenutnim oslobađanjem aktivne supstance. V Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, 13 – 17.10.2010, *Arh farm* 2010; 5: 898-899.
2. Kocić I, Homšek I, Dačević M, Grbić S, Parojčić J, Vučićević K, Prostran M, Miljković B. Simulacije resorpcije levotiroksina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem. Biofarm 2011, 27.10.2011, Beograd, Zbornik radova, poster P6.

## BIOGRAFIJA

Ivana Kocić je rođena 03.01.1982. godine u Aleksincu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju prirodno-matematičkog smera. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2001/2002. godine i diplomirala 24.04.2007. godine, sa prosečnom ocenom 9.81 i ocenom 10 iz diplomskog ispita. U toku studija, od 2002. godine bila je stipendista Ministarstva prosvete, a od 2005. godine i stipendista Fondacije Hemofarm. Školske 2007/2008. godine upisala je doktorske akademske studije iz *Farmakokinetike i kliničke farmacije* na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Nakon diplomiranja 2007. godine, do januara 2008. godine, radila je kao pripravnik u apoteci Prima u Beogradu. Državni ispit položila je 28.10.2008. godine. Od januara 2008. godine zaposlena je na mestu stručnog saradnika u Laboratoriji za stabilnost Kontrole kvaliteta u Galenici a.d., a od juna 2010. godine na mestu samostalnog stručnog saradnika u Službi za ispitivanje stabilnosti u okviru Kontrole kvaliteta Galenike a.d.

Od 2011. godine saradnik je na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Dobitnik je nagrade „Prof. Ivan Berkeš“ za najboljeg studenta diplomiranog farmaceuta u školskoj 2006/2007. godini i nagrade Univerziteta u Beogradu za studenta generacije Farmaceutskog fakulteta u školskoj 2006/2007 godini.



## Изјава о ауторству

Потписани-а Ивана Коцић

број уписа 2/07

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

БИОФАРМАЦЕУТСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ТАБЛЕТА СА ТРЕНУТНИМ

ОСЛОБАЂАЊЕМ ЛЕВОТИРОКСИН-НАТРИЈУМА

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 25.04.2013.

Ивана Коцић

**Изјава о истоветности штампане и електронске  
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Ивана Коцић

Број уписа 2/07

Студијски програм Фармакокинетика и клиничка фармација

Наслов рада Биофармацеутска карактеризација таблета са тренутним  
ослобађањем левотироксин-натријума

Ментор проф. др Бранислава Миљковић и проф. др Јелена Паројчић

Потписани Ивана Коцић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 25.04.2013.

Ивана Коцић

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

БИОФАРМАЦЕУТСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ТАБЛЕТА СА ТРЕНУТНИМ

ОСЛОБАЂАЊЕМ ЛЕВОТИРОКСИН-НАТРИЈУМА

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 25.04.2013.

Јулиана Ђосић

1. Ауторство - Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.