

oslobađanjem

Sandra Grbić*, Jelena Parojčić, Zorica Đurić

Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

*Sandra Grbić tel: +381638611341 Fax: +381113972840
E-mail adresa: gsandra@pharmacy.bg.ac.rs

Kratak sadržaj

Da bi se procenila mogućnost primene laboratorijskih (*in vitro*) i računarskih (*in silico*) metoda za predviđanje apsorpcije lekovite supstance u gastrointestinalnom traktu (GIT-u) i uspostavljanje *in vitro-in vivo* korelacije (IVIVK), neophodno je prethodno identifikovati *in vivo* profil oslobađanja lekovite supstance iz preparata. U slučaju lekovitih supstanci koje, zbog slabe rastvorljivosti, nije moguće primeniti intravenski, apsorpciju nije moguće predvideti primenom konvencionalnih farmakokinetičkih metoda, pa je zato poslednjih godina veliki istraživački interes usmeren ka primeni mehanističkih apsorpcionih modela. Cilj ovog rada je da se: i) primenom *in silico* apsorpcionog modela razvije lek-specifičan model za predviđanje apsorpcije karbamazepina, ii) identifikuje profil *in vivo* oslobađanja koji će služiti kao osnova za uspostavljanje IVIVK, iii) identifikuju biorelevantne specifikacije za brzinu rastvaranja karbamazepina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem i iv) dobijeni rezultati uporede sa rezultatima prethodnih studija. Za *in silico* predviđanje apsorpcije karbamazepina primenjen je GastroPlus™ programski paket. Vrednosti ulaznih parametara potrebnih za simulaciju su preuzete iz literature ili su korišćene *in silico* predviđene i/ili eksperimentalno određene vrednosti. Za utvrđivanje stepena korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka primenjen je konvolucionni pristup uspostavljanju IVIVK. Dobijeni rezultati su pokazali da je primenom *in silico* metode moguće uspešno simulirati apsorpciju karbamazepina nakon oralne primene i da se dobijeni profil koncentracije leka u krvi može koristiti kao ciljani profil za IVIVK i identifikovanje „biorelevantnih“ specifikacija za *in vitro* brzinu rastvaranja karbamazepina iz tableta.

Ključne reči: karbamazepin, *in silico* simulacija apsorpcije, brzina rastvaranja, *in vitro-in vivo* korelacija

Uvod

Procena brzine i stepena apsorpcije, odnosno biološke raspoloživosti lekovitih supstanci iz oralno primenjenih farmaceutskih preparata predstavlja važan korak u razvoju čvrstih farmaceutskih oblika i osnov je razvoja „biorelevantnog“ testa za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz preparata. Prema Biofarmaceutskom sistemu klasifikacije lekova (BSK), ograničavajući faktori za apsorpciju lekovite supstance se mogu identifikovati na osnovu njene rastvorljivosti/brzine rastvaranja u fiziološkim tečnostima i permeabilnosti kroz intestinalnu membranu (1). Kada su u pitanju slabo rastvorljive lekovite supstance (BSK klasa II), za procenu rastvorljivosti *in vivo* potrebno je razmotriti kombinovani uticaj fizičko-hemijskih osobina lekovite supstance i fizioloških uslova u organizmu.

Stepen i brzina kojom lekovite supstance dospevaju u sistemsku cirkulaciju se najčešće procenjuju konvencionalnim farmakokinetičkim metodama (numerička dekonvolucija, metoda Wagner Nelson-a, metoda Loo Riegelman-a), na osnovu podataka o koncentraciji leka u plazmi u toku vremena dobijenih nakon intra- i/ili ekstravaskularne primene leka. No, u slučajevima kada se, zbog slabe rastvorljivosti, lek ne može primeniti u obliku rastvora za intravensku primenu ili kada lek pokazuje nelinearnu kinetiku, primena ovih metoda nije moguća. Iz tog razloga poslednjih godina veliku pažnju privlači razvoj *in silico* metoda kojima je apsorpciju lekovite supstance moguće predvideti na osnovu njenih fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih osobina (2-6). Do sada je u ove svrhe razvijeno nekoliko programskih paketa, od kojih je najšire korišćen GastroPlus™ program (3-11). Ovaj program zahteva veliki broj ulaznih parametara koji se odnose na osobine izabranog fiziološkog sistema, fizičko-hemijske i farmakokinetičke osobine lekovite supstance, kao i izvesne osobine primenjenog farmaceutskog oblika. Čak i male varijacije u vrednostima ulaznih parametara mogu značajno uticati na preciznost predviđanja, pa su procena uticaja pojedinačnih faktora na apsorpciju lekovite supstance i odabir adekvatnih podataka u ovom postupku od ključnog značaja za uspešnu simulaciju.

Karbamazepin (CBZ) se koristi u terapiji epilepsije, bipolarnih afektivnih poremećaja i trigeminalne neuralgije. U pitanju je supstanca koja, zbog visoke vrednosti konstante disocijacije pK_a 13.9 (12), ne jonizuje u fiziološkom opsegu pH vrednosti. Prema kriterijumu BSK, pripada grupi slabo rastvorljivih, visoko permeabilnih supstanci (BSK klasa II), pri čemu literaturni podaci za rastvorljivost u vodi variraju u opsegu 0.11-0.26 mg/ml (što odgovara doznom broju (D_6) od 6.15 do 14.54) (13-17). U literaturi se navodi da je apsorpcija karbamazepina nakon oralne primene spora i varijabilna (18, 19). Naime, kliničke studije su pokazale da postoje značajne varijacije u brzini i obimu apsorpcije ove supstance, kako između pojedinaca, tako i nakon primene različitih preparata (20-22). Sa druge strane, dokumentovane su i studije u kojima su rezultati kliničkog ispitivanja pokazali biološku ekvivalentnost između preparata koji su ispoljili značajne razlike u brzini rastvaranja CBZ *in vitro* (18, 22, 23). S obzirom na to da ne postoje podaci o i.v. primeni rastvora karbamazepina, apsolutna biološka

raspoloživost ove supstance nije poznata, što ograničava primenu nekih konvencionalnih farmakokinetičkih metoda za analizu njene apsorpcije. U literaturi su opisane studije u kojima je za utvrđivanje profila *in vivo* apsorpcije/brzine rastvaranja karbamazepina i procenu *in vitro-in vivo* korelacije (IVIVK) nivoa A primenjen dekonvolucionni pristup zasnovan na profilu apsorpcije izračunatom primenom Wagner-Nelson-ove metode, kao i konvolucionni pristup zasnovan na profilu koncentracije leka u plazmi predviđenom primenom GastroPlus™ programa (7, 9, 18, 21, 22, 24). Polazeći od pretpostavke da se dispozicija karbamazepina u organizmu može opisati jednodimenzionalnim farmakokinetičkim modelom, Homšek i saradnici su *in vivo* dobijene vrednosti o koncentraciji lekovite supstance u plazmi nakon primene dva preparata (tablete sa trenutnim oslobađanjem) karbamazepina analizirali primenom Wagner-Nelsonove metode. Poređenjem dobijenog profila apsorpcije sa profilima brzine rastvaranja karbamazepina *in vitro* u različitim medijumima pokazali su da je u slučaju *in vitro* ispitivanja u određenim medijumima (voda, 0,1 M HCl, acetatni pufer pH 4.5, 1% vodeni rastvor natrijum-laurilsulfata (NaLS)) moguće uspostaviti visok stepen IVIVK za pojedinačne preparate. Međutim, ni u jednom od primenjenih medijuma nije postignuta dobra korelacija za zbirni set podataka za oba ispitivana preparata. Stoga nije bilo moguće identifikovati jedinstven medijum za predviđanje biofarmaceutskih svojstava tableta sa trenutnim oslobađanjem karbamazepina (18). Sa druge strane, rezultati Kovačevića i saradnika, dobijeni primenom gastrointestinalne simulacije u kombinaciji sa IVIVK, ukazali su na to da bi se 1% rastvor NaLS mogao smatrati univerzalnim „biorelevantnim“ medijumom za *in vitro* ispitivanje tableta sa trenutnim i tableta sa kontrolisanim oslobađanjem karbamazepina. Pri ovome je za uspostavljanje IVIVK korišćen zbirni set podataka za tablete sa trenutnim i kontrolisanim oslobađanjem karbamazepina (7).

Kada je u pitanju gastrointestinalna simulacija apsorpcije karbamazepina, u do sada opisanim studijama su za razvijanje modela apsorpcije ove supstance korišćeni različiti ulazni parametri. Tako su Kovačević i saradnici (7) za opisivanje farmakokinetike karbamazepina koristili parametre koji karakterišu jednodimenzionalni model, dok su Zhang i saradnici (9) smatrali da se dispozicija karbamazepina nakon primene tableta sa trenutnim oslobađanjem najbolje može opisati dvodimenzionalnim modelom i, u skladu sa tim, odgovarajućim farmakokinetičkim parametrima. Pored toga, greška predviđanja modela Kovačevića i saradnika i Zhanga i saradnika je procenjena u odnosu na podatke dobijene iz različitih *in vivo* studija. Samim tim su se i razvijeni modeli apsorpcije CBZ u izvesnom stepenu razlikovali.

Cilj ovog rada je da se: i) proceni mogućnost primene GastroPlus™ programskog paketa za *in silico* predviđanje apsorpcije karbamazepina i identifikovanje profila *in vivo* oslobađanja koji će služiti kao osnova za uspostavljanje *in vitro-in vivo* korelacije, ii) identifikuju biorelevantne specifikacije za brzinu rastvaranja karbamazepina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem. Da bi se procenila validnost i robustnost razvijenog modela za *in silico* predviđanje apsorpcije karbamazepina, dobijeni rezultati su

upoređeni sa rezultatima dve prethodno publikovane, nezavisne studije u kojima su za predviđanje apsorpcije ove supstance korišćeni različiti setovi ulaznih podataka.

Ekperimentalni deo

Ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz tableta

Brzina rastvaranja karbamazepina iz komercijalno dostupnih tableta sa trenutnim oslobađanjem, jačine 200 mg (označeni kao preparati CBZ1 i CBZ2), ispitana je u aparaturi sa lopaticom, pri brzini od 75 o/min i temperaturi od 37 ± 0.5 °C, u 900 ml medijuma (voda) bez/sa dodatkom 0.5% i 1% surfaktanta (saharoza laurata (D1216) ili natrijum-laurilsulfata). Uzorkovanje je vršeno u toku 2 h, a količina rastvorenog karbamazepina je određena UV-spektrofotometrijski, na talasnoj dužini apsorpcionog maksimuma ($\lambda = 286 \pm 1$ nm). Ispitivanja su rađena sa po najmanje tri tablete, a prikazani rezultati predstavljaju njihovu srednju vrednost.

Za poređenje profila brzine rastvaranja karbamazepina iz preparata CBZ1 i CBZ2 u različitim medijumima korišćen je model nezavisni matematički pristup koji podrazumeva izračunavanje faktora sličnosti (f_2), prema jednačini (25):

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

gde su: n – broj uzorkovanja, R_i i T_i – procenat oslobođene lekovite supstance nakon vremena t u slučaju referentnog (preparat CBZ1) i test preparata (preparat CBZ2).

In silico predviđanje apsorpcije karbamazepina

Za *in silico* predviđanje apsorpcije CBZ korišćen je GastroPlus™ programski paket (verzija 6.1.0003, Simulations Plus, Inc., Lancaster, CA, USA) zasnovan na primeni ACAT (eng. *Advanced Compartmental Absorption and Transit*) modela apsorpcije i gastrointestinalnog transporta. Kao ulazni parametri u ovom ispitivanju korišćeni su literaturni podaci, kao i *in silico* predviđene i/ili eksperimentalno određene vrednosti (Tabela I). Vrednosti ASF faktora (eng. *Absorption Scale Factors*; faktori proporcionalnosti koji definišu brzinu apsorpcije lekovite supstance u određenom regionu gastrointestinalnog trakta) su optimizovane (koristeći GastroPlus™ modul za optimizaciju) tako da simulirani profil apsorpcije što manje odstupa od *in vivo* uočenih vrednosti (18). Svi ostali parametri koji opisuju fiziologiju humanog GIT-a u stanju „na gladno“ zadržani su na GastroPlus™ preporučenim vrednostima. Za procenu greške predviđanja pojedinačnih farmakokinetičkih parametara (C_{max} , t_{max} , $PIK_{0 \rightarrow \infty}$, $PIK_{0 \rightarrow t}$) korišćen je sledeći izraz:

$$PE(\%) = \frac{A - B}{A} \times 100$$

gde je PE (%) – greška predviđanja izražena u procentima, A – uočena (eksperimentalna) vrednost i B – predviđena (simulirana) vrednost.

Tabela I Ulazni parametri za GastroPlus™ simulaciju apsorpcije karbamazepina: primenjene vrednosti, kao i podaci korišćeni u prethodnim studijama

Table I Summary of input parameters for CBZ gastrointestinal absorption simulation: employed values, along with the data used in previous studies

| Parametar | Primenjene vrednosti | Ref (7) | Ref (9) |
|--|---|------------|------------|
| molekulska masa (g/mol) | 236.3 | | |
| logP | 2.45 ^a | 2.45 | 2.38 |
| pK _a | 13.9 ^b | 11.83 | 12.01 |
| efektivna permeabilnost (x 10 ⁻⁴ cm/s) | 4.3 ^c | | |
| doza leka (mg) | 400 | | |
| zapremina tečnosti uzeta sa lekom (ml) | 250 | 250 | 240 |
| rastvorljivost u vodi (mg/ml) | 0.21 ^d | 0.12 | 0.12 |
| srednje vreme precipitacije (s) | 900 ^e | | |
| difuzioni koeficijent (x 10 ⁻⁵ cm ² /s) | 0.873 ^f | 0.869 | 0.972 |
| gustina čestica leka (g/ml) | 1.2 ^e | 1.2 | 1.5 |
| poluprečnik čestice (μm) | 25 ^e | 25 | 75 |
| telesna masa ispitanika (kg) | 75.5 ^g | 72 | 75 |
| odnos koncentracije leka u krvi/plazmi | 1.6 ^a | / | / |
| slobodna frakcija leka u plazmi, f _u (%) | 25 ^a | 30 | 22 |
| klirens, CL (L/h/kg) | 0.024 ^h | 0.024 | 0.015 |
| volumen distribucije, V _d (L/kg) | 1.26 ^h | 1.26 | 0.81 |
| poluvreme eliminacije, t _{1/2} (h) | 36.39 | 36.39 | 43.38 |
| volumen distribucije u perifernom tkivu, V ₂ (L/kg) | / | / | 0.121 |
| konstanta distribucije, k ₁₂ (1/h) | / | / | 0.036 |
| konstanta distribucije, k ₂₁ (1/h) | / | / | 0.240 |
| vreme simulacije (h) | 120 | 120 | 168 |
| farmaceutski oblik | IR tableta ⁱ /CR <i>integral</i> oblik ⁱ | IR tableta | IR tableta |

^a podaci iz literature (26); ^b podatak iz literature (12); ^c podatak iz literature (27); ^deksperimentalno određena vrednost; ^eGastroPlus™ vrednosti; ^f*in silico* procenjena vrednost na osnovu strukture molekula (ADMETPredictor™ modul); ^gpodatak iz literature (18); ^hpodaci iz literature (7); ⁱkod predviđanja apsorpcije na osnovu fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih osobina lekovite supstance; ^jkod predviđanja profila koncentracije lekovite supstance u plazmi na osnovu podataka o *in vitro* brzini rastvaranja karbamazepina (CR funkcija u GastroPlus™ programu simulira oslobađanje lekovite supstance iz tableta u rastvorenom obliku, dok *integral* oblik znači da se tableta ne raspada u toku prolaska kroz GIT)

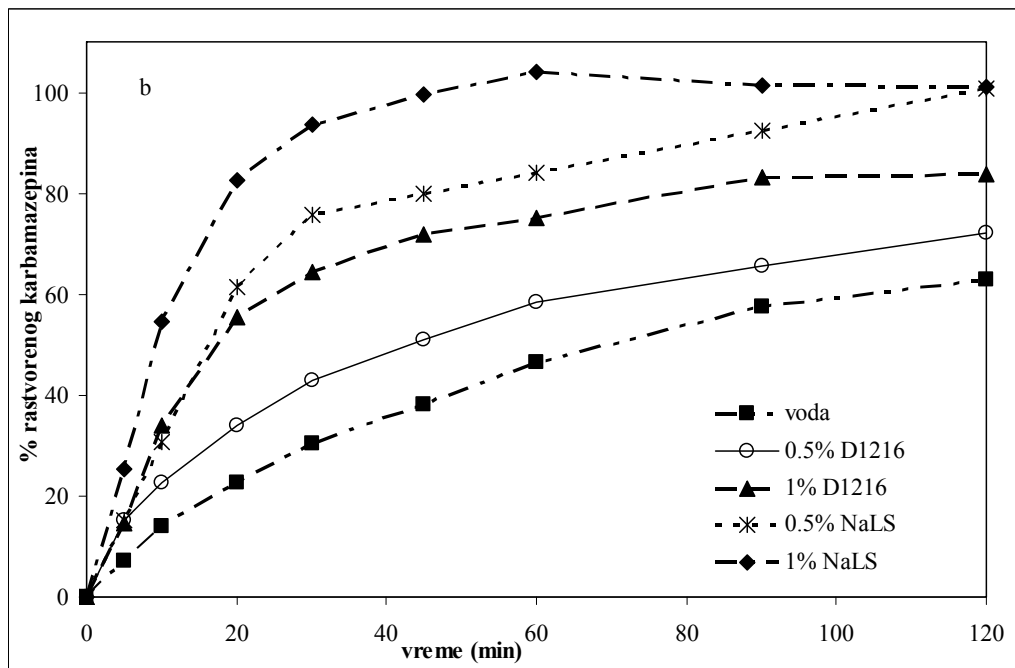
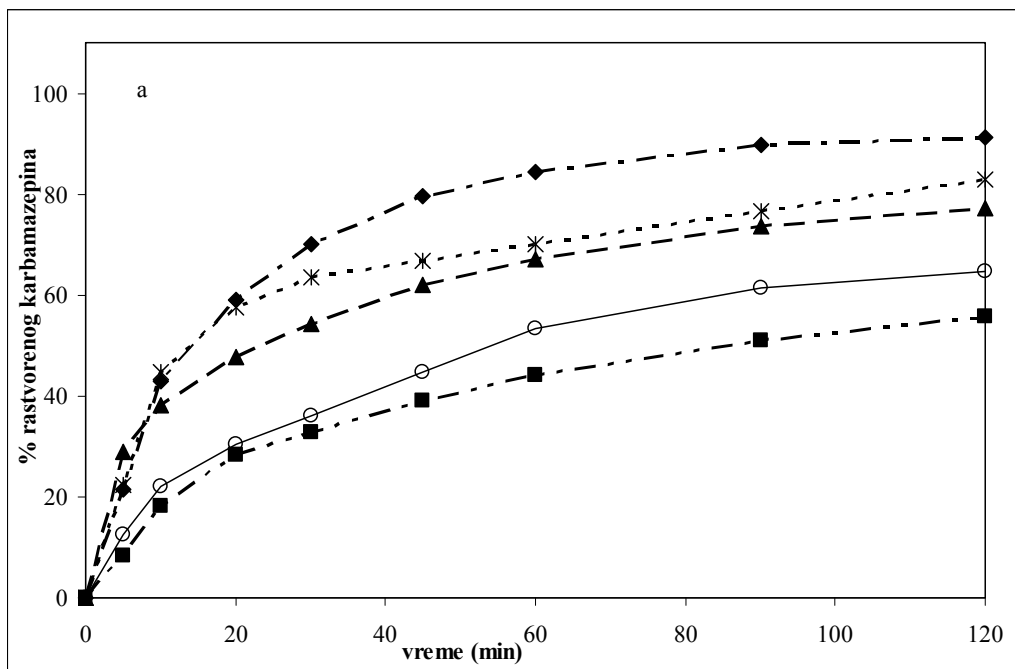
***In vitro-in vivo* korelacija**

Stepen korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka procenjen je primenom konvolucionog pristupa uspostavljanju IVIVK. Pri ovome su hipotetički profili koncentracije lekovite supstance u plazmi u toku vremena, predviđeni na osnovu podataka o brzini rastvaranja karbamazepina *in vitro*, primenom GastroPlus™ programa, upoređeni sa odgovarajućim profilom dobijenim u *in vivo* studiji (18). Stepen korelacije između odgovarajućih *in vitro* i *in vivo* profila procenjen je na osnovu rezultata linearne regresione analize.

Rezultati i diskusija

Ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz tableta

Ispitivanjem brzine rastvaranja karbamazepina iz tableta u različitim medijumima dobijeni su profili prikazani na Slici 1. Prikazani podaci pokazuju da se sa dodatkom surfaktanta u medijum za ispitivanje povećava brzina rastvaranja karbamazepina, a stepen povećanja zavisi od vrste i koncentracije primenjenog surfaktanta. Takođe, uočava se da je brzina rastvaranja karbamazepina iz tableta CBZ2 u svim medijumima veća u odnosu na brzinu rastvaranja iz tableta CBZ1. Slične rezultate su dobili Homšek i saradnici koji su pokazali da je rastvaranje karbamazepina iz generičkog preparata brže u odnosu na rastvaranje iz referentnog preparata i u medijumima bez (voda, puferi pH 1.2, 4.5 i 6.8), kao i medijumima sa dodatkom surfaktanta (0.5% i 1% rastvor NaLS) (18). Različito *in vitro* ponašanje ispitivanih preparata može da bude posledica razlika u sastavu formulacija (izbor pomoćnih materija), postupku izrade i/ili osobinama same aktivne supstance (veličina čestica polazne sirovine). Osim toga, uočene razlike u brzini rastvaranja bi se mogle objasniti i eventualnim razlikama u brzini prelaza anhidrovanog u hidratni, manje rastvorljivi oblik karbamazepina, što zavisi od vrste pomoćnih materija upotrebljenih za izradu tableta, odnosno, njihove sposobnosti da uspore proces transformacije karbamazepina iz anhidrovane u hidratnu formu (28, 29).



Slika 1 Brzina rastvaranja karbamazepina iz tableta CBZ1 (a) i CBZ2 (b)
 Figure 1 Dissolution data for CBZ1 (a) and CBZ2 (b) carbamazepine tablets

Iako su razlike u brzini rastvaranja lekovite supstance iz ispitivanih preparata uočene u svim ispitivanim medijumima, izračunati faktori sličnosti pokazuju da su brzine rastvaranja karbamazepina u medijumima sa NaLS statistički značajne, dok su ispitivanjem u vodi, kao i u medijumima sa dodatkom D1216, razlike u kinetici rastvaranja aktivne supstance manje izražene, odnosno, dobijeni profili se mogu smatrati sličnim (Tabela II). Dobijeni rezultati se u izvesnoj meri razlikuju od rezultata Homšek i saradnika koji su pokazali da se profili brzine rastvaranja karbamazepina iz ispitivanog generičkog i referentnog preparata u medijumima sa dodatkom 0.5% i 1% NaLS statistički značajno razlikuju ($f_2=25.06$ i $f_2=29.72$, redom), sa tim da su razlike u brzini rastvaranja karbamazepina uočene i kada je kao medijum za ispitivanje korišćena voda ($f_2=17.21$) (18).

Tabela II Izračunati faktori sličnosti (f_2) dobijeni poređenjem profila brzine rastvaranja karbamazepina iz preparata CBZ1 i CBZ2 u različitim medijumima

Table II Similarity factors (f_2) for CBZ1 and CBZ2 formulations in different dissolution media

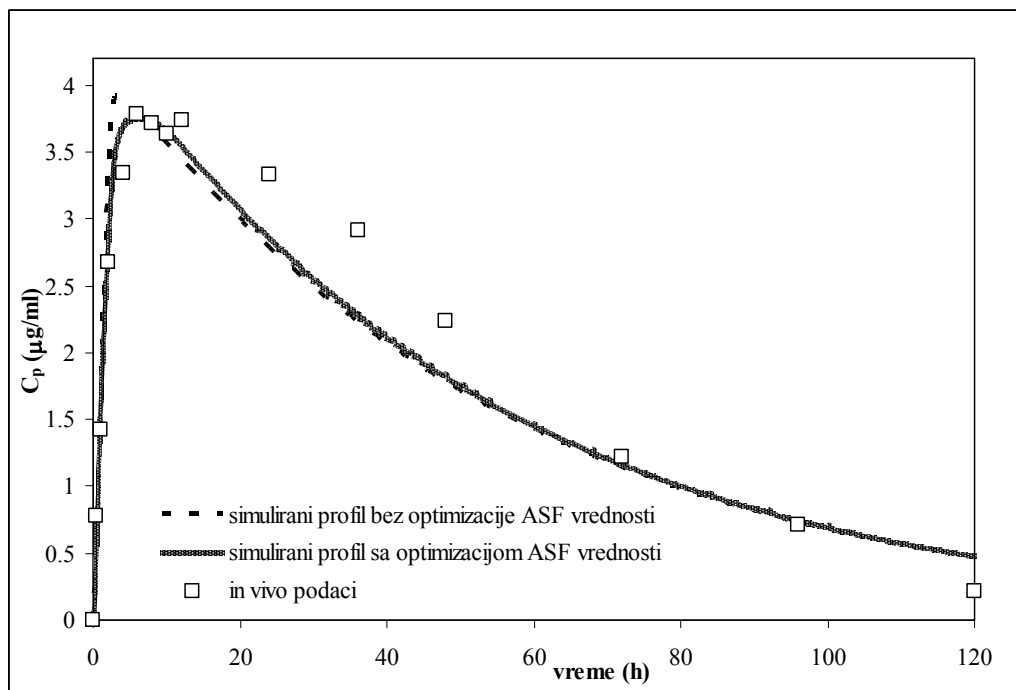
| Medijum | voda | 0.5% D1216 | 1% D1216 | 0.5% NaLS | 1% NaLS |
|---------|-------|------------|----------|-----------|---------|
| f_2 | 67.00 | 64.47 | 51.60 | 44.16 | 38.61 |

***In silico* predviđanje apsorpcije karbamazepina**

Profil apsorpcije karbamazepina, dobijen na osnovu ulaznih podataka navedenih u Tabeli I, kada su za predviđanje korišćene GastroPlusTM vrednosti ASF faktora, ukazao je na znatno bržu apsorpciju karbamazepina u odnosu na *in vivo* uočene vrednosti (Slika 2). Pri tome je greška predviđanja za vreme postizanja maksimalne koncentracije lekovite supstance u plazmi iznosila 43.33% (Tabela III). Da bi se postiglo što manje odstupanje predviđenog profila apsorpcije od srednjeg profila koncentracije karbamazepina u plazmi uočenog u *in vivo* studiji, optimizovane su vrednosti ASF faktora. GastroPlusTM predložene i optimizovane vrednosti ASF faktora su prikazane u Tabeli IV.

Predviđeni profil apsorpcije karbamazepina, dobijen na osnovu izabranih ulaznih podataka (Tabela I) i optimizovanih vrednosti ASF faktora, kao i podaci o koncentraciji lekovite supstance u plazmi nakon oralne primene 400 mg (2 x 200 mg) karbamazepina (18) prikazani su na Slici 2. Predviđeni nivo apsorpcije karbamazepina od 99.89% je u skladu sa literaturnim podacima koji ukazuju na dobru biološku raspoloživost ove supstance nakon oralne primene (30). Slične vrednosti od 98.02%, odnosno, 93% apsorbovanog leka su dobijene i u prethodnim studijama u kojima je za predviđanje apsorpcije CBZ primenjena gastrointestinalna simulacija (7, 9). Farmakokinetički parametri izračunati na osnovu simuliranog profila i odgovarajuće vrednosti dobijene u

in vivo studiji navedeni su u Tabeli III. Izračunate vrednosti za grešku predviđanja za sve posmatrane farmakokinetičke parametre su manje od 10%, što ukazuje na to da se razvijeni model može uspešno koristiti za predviđanje profila apsorpcije karbamazepina.



Slika 2. GastroPlus™ simulirani i srednji profil koncentracije karbamazepina u plazmi *in vivo* (18) nakon oralne primene 400 mg karbamazepina

Figure 2. GastroPlus™ predicted and observed mean carbamazepine plasma concentration–time profiles (18) following oral administration of 400 mg CBZ

U Tabeli III su navedeni i farmakokinetički parametri predviđeni na osnovu prethodno razvijenih modela apsorpcije CBZ (7, 9). Najveće razlike u odnosu na vrednosti predviđene u ovom ispitivanju se uočavaju za t_{max} (14.8% razlike kada se uzmu u obzir vrednosti iz studije Kovačevića i saradnika (7), odnosno, 162.3% razlike prema vrednostima iz studije Zhang-a i saradnika (9)). Značajne razlike su dobijene i za PIK vrednosti kada je za predviđanje korišćen model Zhang-a i saradnika (43% i 47% razlike u vrednostima $PIK_{0 \rightarrow \infty}$ i $PIK_{0 \rightarrow t}$ redom). Pri ovome treba imati u vidu da su pomenuti modeli Kovačevića i saradnika i Zhang-a i saradnika validirani u odnosu na različite *in vivo* profile koncentracije leka u plazmi koji se međusobno značajno razlikuju. U ispitivanju Kovačevića i saradnika su za poređenje sa predviđenim farmakokinetičkim parametrima korišćene iste *in vivo* uočene vrednosti kao i u ovoj studiji, dok je za procenu greške predviđanja modela koji je razvio Zhang sa saradnicima korišćen *in vivo* profil koncentracije leka u plazmi na kome se uočava tzv. „apsorpcioni plato“ (u periodu između 3.7 i 41 h nakon oralne primene tablete

karbamazepina koncentracija leka u plazmi se kretala u opsegu $\pm 20\%$ u odnosu na vrednost C_{max}). No, ako se uzme u obzir da CBZ pokazuje varijabilnu kinetiku nakon oralne primene (npr. literaturni podaci za t_{max} se kreću u opsegu 2 do 24 h (30)), vrednosti farmakokinetičkih parametara predviđene u sva tri pomenuta modela se mogu smatrati prihvatljivim. Prikazani podaci, takođe, pokazuju da forma razvijenog modela apsorpcije zavisi i od izbora vrednosti koje se koriste za procenu tačnosti predviđanja, što ukazuje na to da je pri validaciji modela potrebno razmotriti što širi opseg vrednosti farmakokinetičkih parametara dokumentovanih u literaturi.

Tabela III Poređenje farmakokinetičkih parametara izračunatih na osnovu srednjeg profila koncentracije CBZ u plazmi dobijenog u *in vivo* studiji (18) sa simuliranim vrednostima (PE (%) – greška predviđanja izražena u procentima), zajedno sa vrednostima dobijenim gastrointestinalnom simulacijom apsorpcije CBZ u prethodnim studijama

Table III Comparison of pharmacokinetic parameters between simulated and *in vivo* observed data (18) for CBZ following oral administration of a single 400 mg dose from IR tablet (PE (%) – percent prediction error), along with the values obtained by gastrointestinal simulation of CBZ absorption in previous studies

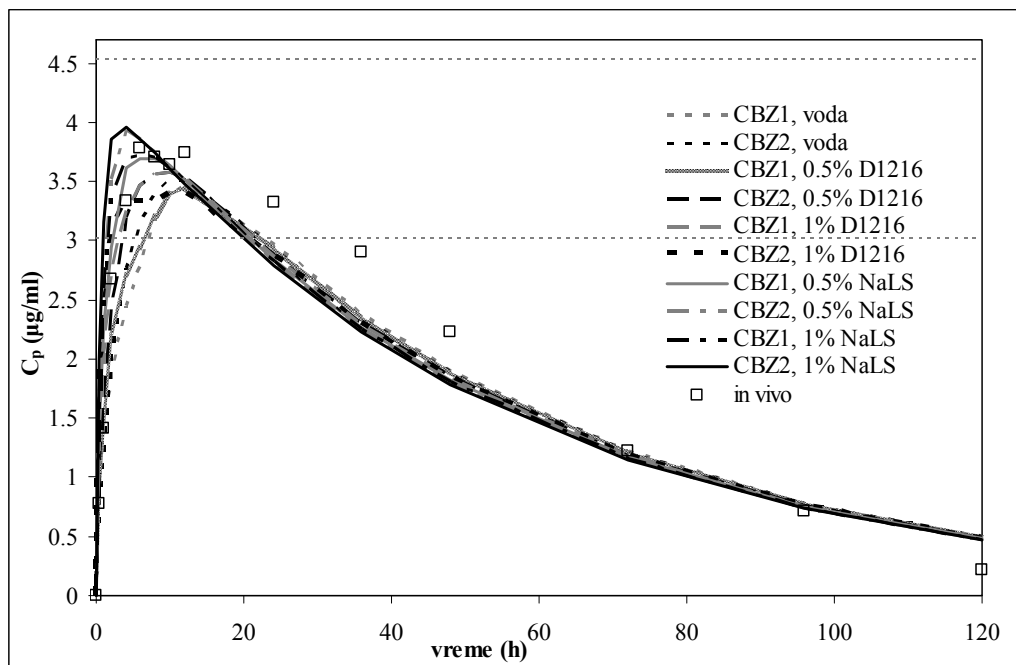
| Parametar | Izračunata vrednost (<i>in vivo</i>) | Predviđena vrednost bez optimizacije ASF vrednosti | PE (%) | Predviđena vrednost sa optimizacijom ASF vrednosti | PE (%) | Vrednost iz ref (7) | Vrednost iz ref (9) |
|---|--|--|--------|--|--------|---------------------|---------------------|
| C_{max} ($\mu\text{g/ml}$) | 3.78 | 3.92 | -3.77 | 3.75 | 0.75 | 3.76 | 3.71 |
| t_{max} (h) | 6.00 | 3.40 | 43.33 | 6.10 | -1.67 | 7.00 | 16.00 |
| $PIK_{0 \rightarrow \infty}$ ($\mu\text{g h/ml}$) | 229.08 | 227.15 | 0.84 | 231.28 | -0.96 | 226.90 | 330.00 |
| $PIK_{0 \rightarrow t}$ ($\mu\text{g h/ml}$) | 224.58 | 201.98 | 10.06 | 205.28 | 8.59 | 201.20 | 301.60 |

Tabela IV GastroPlus™ predložene i optimizovane vrednosti ASF faktora
Table IV GastroPlus™ default and optimized ASF values

| Deo GIT-a | GastroPlus™ vrednost | Optimizovana vrednost |
|-----------|----------------------|-----------------------|
| Želudac | 0 | 0 |
| Duodenum | 2.769 | 30.600 |
| Jejunum 1 | 2.720 | 1.063 |
| Jejunum 2 | 2.705 | 1.000 |
| Ileum 1 | 2.668 | 4.398 |
| Ileum 2 | 2.624 | 0.025 |
| Ileum 3 | 2.559 | 0.036 |
| Cekum | 0.066 | 0.198 |

***In vitro-in vivo* korelacija**

GastroPlus™ simulirani, hipotetički profili koncentracije karbamazepina u plazmi, predviđeni na osnovu različitih profila brzine rastvaranja lekovite supstance *in vitro* (prikazanih na Slici 1), zajedno sa odgovarajućim *in vivo* uočenim profilom koncentracije karbamazepina u plazmi (18) prikazani su na Slici 3.



Slika 3 Hipotetički profili koncentracije karbamazepina u plazmi predviđeni na osnovu različitih profila brzine rastvaranja lekovite supstance *in vitro*, zajedno sa *in vivo* uočenim profilom koncentracije karbamazepina u plazmi (18) (simulirani profili CBZ1 u 1% rastvoru D1216 i CBZ2 u 0.5% rastvoru D1216 se međusobno preklapaju; horizontalna isprekidana linija predstavlja 20% odstupanja u vrednosti C_{max} u odnosu na *in vivo* uočeni podatak)

Figure 3 GastroPlus™ simulated carbamazepine *in vivo* profiles, estimated on the basis of different dissolution profiles *in vitro*, along with the actual *in vivo* data (18) (simulated profiles CBZ1 in 1% D1216, and CBZ2 in 0.5% D1216 overlap; dotted lines represent 20% deviation in C_{max} compared to the actual value observed *in vivo*)

Dobijeni rezultati pokazuju da se, bez obzira na razlike u kinetici rastvaranja lekovite supstance *in vitro*, simulacijom dobijaju slični farmakokinetički profili, koji se po vrednosti PIK i C_{max} , kao osnovnim parametrima za procenu biološke raspoloživosti/biološke ekvivalentnosti preparata, ne razlikuju značajno od *in vivo* uočenih vrednosti (Tabela V). Značajne razlike su uočene samo u vremenu postizanja maksimalne koncentracije lekovite supstance u plazmi (t_{max}), čije su se vrednosti kretale u opsegu od 3.18 h u slučaju hipotetičkog profila CBZ2 u 1% NaLS do 12.9 h u slučaju profila CBZ1 u vodi.

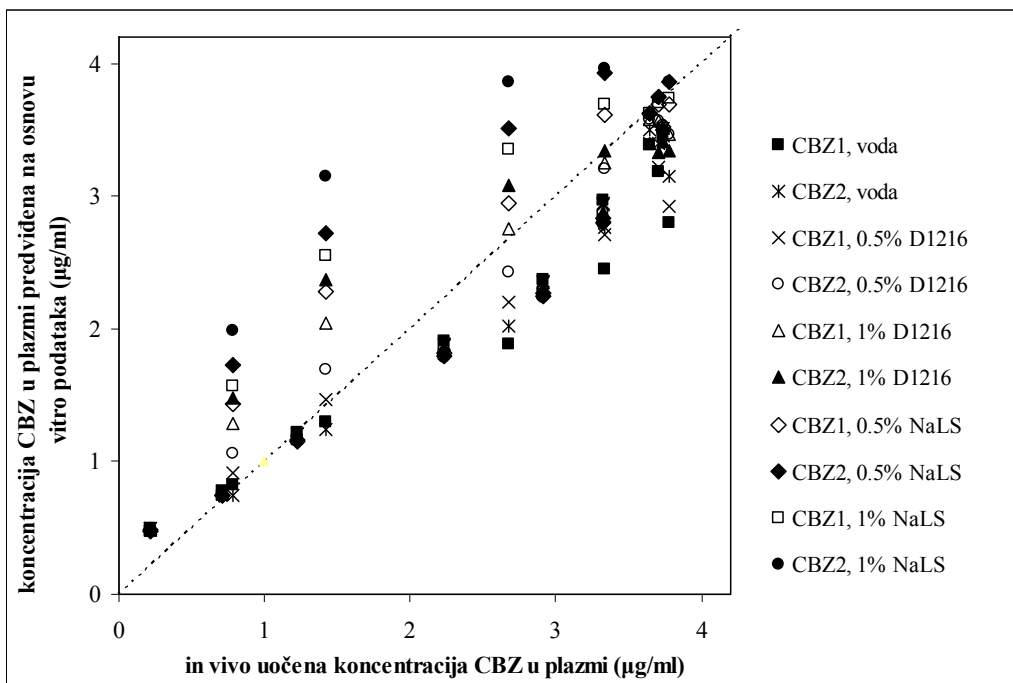
Tabela V Poređenje farmakokinetičkih parametara predviđenih na osnovu različitih profila brzine rastvaranja karbamazepina *in vitro* sa *in vivo* vrednostima

Table V Comparison of pharmacokinetic parameters simulated on the basis of different *in vitro* dissolution profiles with *in vivo* observed values

| <i>In vivo</i> vrednosti: $C_{max} = 3.78 \mu\text{g/ml}$; $PIK_{0 \rightarrow \infty} = 229.08 \mu\text{g h/ml}$ (18) | | | | | |
|---|--|----------|--------|--|--------|
| <i>In vitro</i> profil | C_{max} | | | $PIK_{0 \rightarrow \infty}$ | |
| | Predviđena vrednost ($\mu\text{g/ml}$) | vrednost | PE (%) | Predviđena vrednost ($\mu\text{g h/ml}$) | PE (%) |
| CBZ1, voda | 3.46 | | -9.11 | 231.13 | 0.89 |
| CBZ2, voda | 3.52 | | -7.50 | 231.17 | 0.90 |
| CBZ1, 0.5% D1216 | 3.46 | | -9.36 | 231.17 | 0.90 |
| CBZ2, 0.5% D1216 | 3.59 | | -5.38 | 231.23 | 0.93 |
| CBZ1, 1% D1216 | 3.58 | | -5.63 | 231.24 | 0.93 |
| CBZ2, 1% D1216 | 3.41 | | -10.85 | 231.25 | 0.94 |
| CBZ1, 0.5% NaLS | 3.70 | | -2.21 | 231.29 | 0.96 |
| CBZ2, 0.5% NaLS | 3.93 | | 3.91 | 231.32 | 0.97 |
| CBZ1, 1% NaLS | 3.74 | | -1.20 | 231.3 | 0.96 |
| CBZ2, 1% NaLS | 3.98 | | 5.09 | 231.33 | 0.97 |

Kovačević i saradnici (7) su simulirali profil apsorpcije CBZ na osnovu podataka o brzini rastvaranja lekovite supstance *in vitro* u različitim puferima, kao i u medijumima sa dodatkom 0.1-1% NaLS i došli do sličnog zaključka da se predviđeni farmakokinetički profili međusobno ne razlikuju značajno. Ovakvi rezultati dodatno potvrđuju pretpostavku da je dispozicija karbamazepina u organizmu primarno definisana njegovim farmakokinetičkim karakteristikama (dugo poluvreme eliminacije), a ne osobinama primenjenog farmaceutskog oblika.

U cilju uspostavljanja IVIVK nivoa A između srednjeg profila koncentracije karbamazepina u plazmi uočenog u *in vivo* studiji i odgovarajućih vrednosti predviđenih na osnovu različitih *in vitro* podataka, konstruisan je korelacioni dijagram prikazan na Slici 4. Linearnom regresionom analizom zbirnog seta podataka za preparate CBZ1 i CBZ2, dobijeni su statistički parametri na osnovu kojih je procenjen stepen korelacije između *in vitro* i *in vivo* podataka (Tabela VI).



Slika 4 Korelacioni dijagram između *in vivo* uočenih vrednosti za koncentraciju karbamazepina u plazmi i odgovarajućih vrednosti predviđenih na osnovu različitih *in vitro* profila brzine rastvaranja (GastroPlus™ generisane vrednosti)
 Figure 4 IVIVC plot for carbamazepine IR tablets

Tabela VI Statistički parametri *in vitro-in vivo* korelacije
 Table VI Statistical parameters of the obtained IVIVC

| Medijum | a | r |
|------------|--------|--------|
| voda | 0.8031 | 0.9563 |
| 0.5% D1216 | 0.8171 | 0.9636 |
| 1% D1216 | 0.7956 | 0.9119 |
| 0.5% NaLS | 0.8426 | 0.8454 |
| 1% NaLS | 0.8194 | 0.7700 |

a - koeficijent pravca (nagib prave); r - koeficijent korelacije

Dobijeni rezultati pokazuju da je najveći stepen korelacije sa *in vivo* podacima postignut u slučaju profila brzine rastvaranja karbamazepina u medijumu sa 0.5% D1216 ($r = 0.9636$, $a = 0.8171$), mada je visok stepen korelacije postignut i u slučaju profila brzine rastvaranja u vodi ($r = 0.9563$, $a = 0.8031$), kao i u medijumu sa 1% D1216 ($r = 0.9119$, $a = 0.7956$). Najveće odstupanje od profila apsorpcije karbamazepina *in vivo* uočeno je u slučaju *in vitro* ispitivanja u medijumima sa dodatkom NaLS ($r = 0.8454$ i $a = 0.8426$ u medijumu sa 0.5% NaLS, odnosno, $r = 0.77$ i $a = 0.8194$ u medijumu sa 1% NaLS). U radu Homšek i saradnika (18) je, takođe, pokazano da se 0.5% i 1% rastvor NaLS ne mogu koristiti kao univerzalni medijumi za predviđanje ponašanja CBZ *in vivo*. Naime, u pomenutom ispitivanju je pokazano da se ispitivanjem u 1% rastvoru NaLS može uspostaviti korelacija 1:1 sa *in vivo* podacima samo u slučaju pojedinačnih tableta karbamazepina. Međutim, korelacija nivoa A za zbirni set podataka za oba ispitivana preparata u ovoj studiji nije uspostavljena.

Izbor biorelevantnog medijuma/specifikacija za ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz tableta

Američka farmakopeja za ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem propisuje upotrebu vode sa dodatkom 1% NaLS (900 ml), u aparaturi sa lopaticom, pri brzini od 75 o/min, pri čemu se kao zahtev postavlja da se najmanje 75% od deklarisanе količine karbamazepina rastvori za 60 min (test 1), odnosno, da se za 15 min rastvori 45-75% supstance i ne manje od 75% za 60 min (test 2) ili da se za 15 min rastvori 60-85% supstance i ne manje od 75% za 60 min izvođenja testa (test 3) (31). Međutim, dobijeni rezultati koji pokazuju da ispitivanjem brzine rastvaranja karbamazepina u medijumu sa 1% NaLS nije moguće uspostaviti IVIVK nivoa A ukazuju na to da primena ovog medijuma nije pogodna za predviđanje ponašanja karbamazepina *in vivo*. Na isti zaključak navode i rezultati uporednog ispitivanja brzine rastvaranja karbamazepina iz tableta koji su pokazali da se profili brzine rastvaranja lekovite supstance iz međusobno biološki ekvivalentnih preparata CBZ1 i CBZ2 u 1% rastvoru NaLS ne mogu smatrati sličnim (Tabela II). Sa druge strane, dobijeni rezultati pokazuju da se ispitivanjem brzine rastvaranja karbamazepina u vodi bez/sa dodatkom 0.5% ili 1% D1216 dobijaju rezultati koji daju dobru korelaciju sa *in vivo* uočenim vrednostima. Stoga bi se ovaj medijum mogao predložiti kao biorelevantni za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz tableta sa trenutnim oslobađanjem. No, da bi ovaj predlog bio šire prihvaćen, potrebno je izvršiti dodatna *in vitro* ispitivanja i drugih tableta karbamazepina sa trenutnim oslobađanjem i dobijene rezultate uporediti sa odgovarajućim podacima dobijenim u kliničkim studijama. Takođe, dobijeni rezultati, kao i rezultati prethodnih studija (7, 18), navode na zaključak da se, sa ciljem obezbeđenja biološke ekvivalentnosti preparata, može uspostaviti znatno šira specifikacija za brzinu rastvaranja karbamazepina (oko 45-75% rastvorene supstance za 60 minuta ispitivanja) u odnosu na aktuelne zahteve američke farmakopeje.

Zahvalnica

Ovaj rad je urađen u okviru projekta TR-34007: Razvoj proizvoda i tehnologija koje obezbeđuju željeno oslobađanje lekovitih supstanci iz čvrstih farmaceutskih oblika, finansiranog od strane Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije.

Literatura

1. Amidon GL, Lennernas H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharm Res* 1995; 12: 413–20.
2. Yu LX, Lipka E, Crison JR, Amidon G. Transport approaches to the biopharmaceutical design of oral drug delivery systems: prediction of intestinal absorption. *Adv Drug Deliv Rev* 1996 ; 19: 359-76.
3. Okumu A, DiMaso M, Löbenberg R. Computer simulations using GastroPlus™ to justify a biowaiver for etoricoxib solid oral drug products. *Eur J Pharm Biopharm* 2009; 72: 91-8.
4. Norris DA, Leesman GD, Sinko PJ, Grass GM. Development of predictive pharmacokinetic simulation models for drug discovery. *J Control Release* 2000; 65: 55–62.
5. 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: S41-67.
6. Yokoe J, Iwasaki N, Haruta S, Kadono K, Ogawara K, Higaki K *et al.* Analysis and prediction of absorption behavior of colon-targeted prodrug in rats by GI-transit-absorption model. *J Control Release* 2003; 86: 305–13.
7. Kovačević I, Parojčić J, Homšek I, Tubić-Grozdanis M, Langguth P. Justification of biowaiver for carbamazepine, a low soluble high permeable compound, in solid dosage forms based on IVIVC and gastrointestinal simulation. *Mol Pharm* 2008; 6(1): 40–7.
8. Huang W, Lee SL, Yu LX. Mechanistic approaches to predicting oral drug absorption. *AAPS J* 2009; 11(2): 217-24.
9. Zhang X, Lionberger RA, Davit BM, Yu LX. Utility of physiologically based absorption modeling in implementing quality by design in drug development. *AAPS J* 2011; 13(1): 59-71.
10. Jones HM, Gardner IB, Collard WT, Stanley PJ, Oxley P, Hosea NA *et al.* Simulation of human intravenous and oral pharmacokinetics of 21 diverse compounds using physiologically based pharmacokinetic modelling. *Clin Pharmacokinet* 2011; 50(5): 331-47.
11. Reddy MB, Connor A, Brennan BJ, Morcos PN, Zhou A, McLawhon P *et al.* Physiological modeling and assessments of regional drug bioavailability of danoprevir to determine whether a controlled release formulation is feasible. *Biopharm Drug Dispos* 2011; 32(5): 261-75.
12. Tadkaew N, Sivakumar M, Khan SJ, McDonald JA, Nghiem LD. Effect of mixed liquor pH on the removal of trace organic contaminants in a membrane bioreactor. *Bioresour Technol* 2010; 101: 1494–1500.
13. Hemenway J, Jarho P, Henri J, Nair S, Vandervelde D, Stella G. Preparation and physicochemical characterization of a novel water-soluble prodrug of carbamazepine. *J Pharm Sci* 2010; 99(4): 1810-25.
14. Loftsson T, Hreinsdóttir D. Determination of aqueous solubility by heating and equilibration: a technical note. *AAPS PharmSciTech* 2006; 7(1): E4.
15. Smith JS, MacRae RJ, Snowden MJ. Effect of SBE7-b-cyclodextrin complexation on carbamazepine release from sustained release beads. *Eur J Pharm Biopharm* 2005; 60: 73–80.

16. Bhise SB, Rajkumar M. Effect of HPMC on solubility and dissolution of carbamazepine form III in simulated gastrointestinal fluids. *Asian J Pharm* 2008; 2(1): 38-42.
17. Lee H, Park SA, Sah H. Surfactant effects upon dissolution patterns of carbamazepine immediate release tablet. *Arch Pharm Res* 2005; 28(1): 120-6.
18. Homsek I, Parojcic J, Cvetkovic N, Popadic D, Djuric Z. Biopharmaceutical characterization of carbamazepine immediate release tablets. In vitro-in vivo comparison. *Arzneimittelforschung*. 2007; 57(8): 511-6.
19. Riad LE, Chan KK, Wagner WE. Simultaneous first and zero order absorption of carbamazepine tablets in humans. *J Pharm Sci*. 1986; 75: 897-900.
20. Meyer MC, Straughn AB, Jarvi EJ, Wood GC, Pelsor FR, Shah VP. The bioinequivalence of carbamazepine tablets with a history of clinical failures. *Pharm Res*. 1992, 9(12): 1612-6.
21. Lake OA, Olling M, Barends DM. In vitro/in vivo correlations of dissolution data of carbamazepine immediate release tablets with pharmacokinetic data obtained in healthy volunteers. *Eur J Pharm Biopharm*. 1999; 48: 13-9.
22. Jung H, Milan RC, Girard ME, Leon F, Montoya MA. Bioequivalence study of carbamazepine tablets: in vitro/in vivo correlation. *Int J Pharm*. 1997; 152: 37-44.
23. Olling M, Mensinga TT, Barends DM, Groen C, Lake OA, Meulenbelt J. Bioavailability of carbamazepine from four different products and occurrence of side effects. *Biopharm Drug Dispos*. 1999; 20: 19-28.
24. Meyer MC, Mhatre SRM, Shah VP, Williams RL, Lesko LJ. The relative bioavailability and in vivo-in vitro correlations for four marketed carbamazepine tablets. *Pharm Res*. 1998; 15: 1787-91.
25. Moore JW, Flanner HH. Mathematical comparison of dissolution profiles. *Pharm Technol* 1996; 6: 64-74.
26. Galichet LY, ed. Clarke's analysis of drugs and poisons, 3rd ed. London · Chicago: Pharmaceutical Press; 2004.
27. Dressman JB, Lennernäs H, eds. Oral drug absorption prediction and assessment. New York · Basel: Marcel Dekker, Inc; 2000.
28. Otsuka M, Ohfusa T, Matsuda Y. Effect of binders on polymorphic transformation kinetics of carbamazepine in aqueous solution. *Colloids Surfaces B: Biointerf*. 2000; 17: 145-52.
29. Prajapati T, Patel P. Influence of hydrophilic polymers on crystal property and solubility characteristics of carbamazepine. *PharmTech*. 2010; 2(1): 189-200.
30. Bauer LA. Applied clinical pharmacokinetics. 2nd ed. The McGraw-Hill Companies, Inc, 2008: 552.
31. The United States Pharmacopoeia 32/National Formulary 27, Rockville MD: United States Pharmacopoeia Convention Inc, 2009

Mechanistic simulation of carbamazepine absorption after oral administration of immediate release tablets

Sandra Grbić, Jelena Parojčić, Zorica Đurić

University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology and Cosmetology, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

Summary

The main prerequisite to establish quantitative *in vitro-in vivo correlation* (IVIVC) and define biorelevant *in vitro* methodology is to identify drug dissolution profile *in vivo*. When intravenous data are not available due to poor drug solubility, oral drug absorption cannot be estimated by means of conventional pharmacokinetic analysis. Development of the mechanistic absorption models has therefore received widespread attention over the past few years. The objective of this study is to: i) develop drug-specific absorption model for carbamazepine using *in silico* absorption model, ii) use the generated absorption model to provide the target *in vivo* dissolution profile for IVIVC, iii) identify biorelevant dissolution specifications for carbamazepine immediate-release tablets, and iv) compare the obtained results with the results of the previous studies. GastroPlus™ software package was used for computer simulations. The required input parameters were experimentally determined, *in silico* predicted and/or taken from the literature. Convolution approach was applied to assess the relationship between the *in vitro* and *in vivo* data. The presented data demonstrated that *in silico* simulation technology can be successfully used to predict carbamazepine absorption profile, and that the generated plasma concentration profile can serve as the target profile for IVIVC and identification of biorelevant dissolution specifications for carbamazepine immediate-release tablets.

Key words: carbamazepine, *in silico* absorption simulation, dissolution, *in vitro-in vivo* correlation
