

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Olivera Lj. Lavrič

**FARMACEUTSKI RAZVOJ TABLETA SA  
PULSNIM OSLOBAĐANJEM  
KARVEDILOLA TEHNIKAMA  
ELEKTROPREDENJA I OBLAGANJA  
KOMPRESIJOM**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Olivera Lj. Lavrič

**PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT OF  
PULSATILE RELEASE CARVEDILOL  
TABLETS USING ELECTROSPINNING  
AND COMPRESSION COATING  
TECHNIQUES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

ČLANOVI KOMISIJE

Mentor

1. \_\_\_\_\_

Dr sc. Svetlana Ibrić, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Mentor

2. \_\_\_\_\_

Dr sc. Jelena Đuriš, vanredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

3. \_\_\_\_\_

Dr sc. Vesna Radojević, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu – Tehnološko–metalurški fakultet

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

## Farmaceutski razvoj tableta sa pulsним oslobađanjem karvedilola tehnikama elektropredenja i oblaganja kompresijom

### Sažetak

Cilj ovog istraživanja bio je razvoj tableta sa pulsним oslobađanjem karvedilola, pogodnih za korišćenje u hronoterapiji, korišćenjem tehnika elektropredenja i oblaganja kompresijom. Istraživanje se sastojalo iz četiri dela.

U prvom delu istraživanja vršeno je ispitivanje stepena mešanja karvedilola i Soluplus<sup>®</sup> polimera korišćenjem dve metode. Najpre, određivanjem razlike ukupnih parametara rastvorljivosti ove dve komponente, a potom i određivanjem *Flory-Huggins* interakcionog parametra. Parcijalni i ukupni parametar rastvorljivosti karvedilola dobijeni su *Stefanis-Panayiotou* metodom, a potom je određena razlika ukupnog parametra rastvorljivosti karvedilola i polimera. Izračunata vrednost iznosila je 5,1 MPa<sup>1/2</sup>, i ukazala je da u sistemu ove dve komponente najverovatnije dolazi do mešanja. Rezultati druge metode, tj. određena vrednost interakcionog parametra, koja je iznosila -2,3054; ukazala je na veliku verovatnoću da se karvedilol i Soluplus<sup>®</sup> mešaju.

U drugoj fazi eksperimentalnog istraživanja vršen je razvoj formulacije nanovlakana Soluplus<sup>®</sup>-a tehnikom elektropredenja. Određen je region rastvorljivosti za polimer Soluplus<sup>®</sup> na ternernom grafiku, koristeći frakcione parametre rastvorljivosti odabranih rastvarača. Potom su rastvarači iz definisanog regiona rastvorljivosti kategorisani na osnovu njihove dielektrične konstante, kao i sa aspekta mogućnosti rastvaranja karvedilola, u cilju procene njihove pogodnosti za proces elektropredenja. U preliminarnoj fazi, izvršeno je elektropredanje Soluplus<sup>®</sup>-a u različitim rastvaračima, gde je na osnovu posmatranja morfologije dobijenih vlakana pod optičkim mikroskopom, kao i na osnovu stabilnosti procesa (pojavom *Taylor*-ove kupe), definisan optimalan rastvarač za dobijanje nanovlakana Soluplus<sup>®</sup>-a impregniranih karvedilolom. Definisane su formulacije sa različitim udelom karvedilola (5-50% m/m u odnosu na suhu masu vlakana) u 20% rastvoru Soluplus<sup>®</sup>-a, u smeši rastvarača aceton-hloroform (90:10 (m/m)), i izvršena je karakterizacija dobijenih nanovlakana. Rezultati su pokazali da je procenat inkorporiranog karvedilola u vlaknima bio od 84 do 93%. Skenirajuća elektronska mikroskopija je pokazala da su dobijena vlakna uniformne, glatke strukture, pri čemu se sa povećanjem udela karvedilola smanjuje broj proširenja na vlaknima. Pokazano je da nema kristala karvedilola na površini vlakana, čime je pretpostavljeno da je inkorporiran u vlakna, a diferencijalna skenirajuća kalorimetrija je ukazala na odsustvo kristalnog oblika karvedilola u svim formulacijama. Infracrvena spektroskopija sa *Furijeovom* transformacijom je pokazala odsustvo karakterističnih pikova karvedilola u nanovaknima. Brzina rastvaranja karvedilola iz nanovlakana bila je veća u odnosu na kristalni oblik čiste supstance (karvedilola).

U trećoj fazi eksperimentalnog istraživanja cilj je bio razvoj formulacija tableta sa trenutnim oslobađanjem karvedilola korišćenjem direktne kompresije. Ispitivano je postojanje razlike u brzini rastvaranja karvedilola između tableta koje su sadržale konvencionalne ekscipijense i tableta dobijenih kompresijom nanovlakana Soluplus<sup>®</sup>-a impregniranih karvedilolom. Brzina rastvaranja karvedilola se značajno razlikovala samo u prvih 15 minuta. Karvedilol se brže rastvarao iz tableta dobijenih kompresijom

nanovlakana u prvih 15 minuta, dok je do kraja ispitivanja ukupna količina rastvorenog karvedilola iz svih formulacija bila približno ista.

Cilj četvrte faze eksperimentalnog istraživanja bio je razvoj formulacija tableta sa odloženim oslobađanjem karvedilola, primenom tehnike oblaganja kompresijom i korišćenjem eksperimentalnog dizajna i analize rizika pomoću FMEA (engl. *Failure Mode and Effect Analysis*) tehnike. Definisani su kritični atributi materijala i procesni parametri, kao i potencijalna odstupanja koja bi uticala na kritične attribute kvaliteta (engl. *Critical Quality Attributes*, CQAs) tableta obloženih kompresijom. FMEA analiza je ukazala na veliki broj faktora koji mogu značajno uticati na kritične attribute kvaliteta i koje bi trebalo kontrolisati. Sprovedena su tri seta punog  $2^2$  eksperimentalnog dizajna. U prvom setu eksperimenata procenjivan je uticaj superdezintegratora (natrijum-skrobglikolata i krosprovidona) u jezgru tableta, i koncentracije polimera (polietilenoksid, Polyox WSR N60K) u omotaču na CQAs. Rezultati su pokazali statistički značajan uticaj koncentracije polimera na vreme odlaganja oslobađanja karvedilola (*lag time*), gde se povećanjem koncentracije polimera *lag time* povećavao od 2,5 od 4 h. Na količinu oslobođenog karvedilola iz obloženih tableta, statistički značajan uticaj imao tip superdezintegratora. U toku 1,5 h nakon *lag time* iz formulacija sa SSG oslobodilo se približno 45 i 30% karvedilola, dok se kod jezgara sa CP oslobodilo manje od 30 i manje od 10%, za koncentracije polimera u omotaču 30 i 35% respektivno. U drugom eksperimentalnom setu, ispitivan je i uticaj koncentracije natrijum-hlorida i SSG na CQAs, dok je u trećem setu ispitivan uticaj koncentracije manitola i Polyox WSR N60K. Dobijeni rezultati su pokazali da na ukupnu količinu oslobođenog karvedilola statistički značajno utiče dodatak natrijum-hlorida ili manitola u jezgro tableta, dok na *lag time*, statistički značajno utiče dodatak natrijum-hlorida. Najbrže rastvaranje karvedilola iz tableta obloženih kompresijom postignuto je iz tableta koje su sadržale jezgro dobijeno kompresijom nanovlakana i iz formulacije sa 10% natrijum-hlorida u jezgru. Iz ovih formulacija je u toku 1 h nakon *lag time* oslobođeno 64 i 67% karvedilola, respektivno. Međutim, razlika među njima bila je u dužini *lag time*, gde su formulacije sa natrijum-hloridom imale *lag time* 4, a formulacije sa nanovlaknima u jezgru 2,5 h. Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja karvedilola iz tableta obloženih kompresijom, pokazali su da je oblaganje kompresijom pogodna tehnika za postizanje odloženog oslobađanja, kao i da je primena nanovlakana u jezgru tableta bolja u odnosu na upotrebu superdezintegratora i manitola za postizanje bržeg oslobađanja karvedilola.

*Ključne reči: karvedilol, stepen mešanja, elektropredenje, oblaganje kompresijom, pulsno oslobađanje.*

## Pharmaceutical development of pulsatile release carvedilol tablets using electrospinning and compression coating techniques

### Abstract

The aim of this work was the development of tablets with pulse release profile of carvedilol, suitable for chronotherapy. Electrospinning and compression coating were used in the preparation of tablets. The research activities were divided in four parts.

In the first part, the degree of miscibility of carvedilol with polymers was studied using two methods. Using the first method, the difference of total solubility parameters of the two components of mixture was determined, while for the second method, the calculation of *Flory-Huggins* interaction parameter was made. Partial and total solubility parameters of carvedilol were calculated according to the method developed by *Stefanis-Panayiotou* which was followed by calculating the difference of total solubility parameters of carvedilol and polymer. The calculated value was  $5.1\text{MPa}^{1/2}$  suggesting that mixing of the two components would most likely occur. The determination of *Flory-Huggins* interaction parameter resulted in the value of interaction parameter of  $-2.3054$ , implying, with high likelihood, that carvedilol and Soluplus<sup>®</sup> would form a mixture.

In the second part of research activities Soluplus<sup>®</sup> nanofibers were developed using electrospinning technique. The solubility region of Soluplus<sup>®</sup> polymer in selected solvents was determined by using ternary diagram constructed by employing fractional solubility parameters. Solvents from the defined solubility region were then categorized according to their dielectric constants as well as their ability to dissolve carvedilol in order to evaluate their suitability for the electrospinning process. In the preliminary steps, Soluplus<sup>®</sup> was dissolved in different selected solvents and then electrospun. Process stability, assessed by observing the occurrence (or absence) of *Taylor cone*, and the resulting fiber morphology, assessed by optical microscopy, were used to define the optimal solvent for Soluplus<sup>®</sup> nanofibers with impregnated carvedilol. 20% solutions of Soluplus<sup>®</sup> in a mixture of acetone-chloroform (90:10 (m/m)) with added carvedilol (5-50% of total dry mass) were electrospun and the resulting nanofibers subsequently characterized. Encapsulation efficiency of carvedilol in Soluplus<sup>®</sup> nanofibers was found to be 84% to 93%. Scanning electron microscopy of electrospun samples revealed uniform nanofibers with smooth surfaces, where increasing mass percentage of carvedilol decreased the number and occurrence of beads. Absence of crystalline particles of carvedilol on the surface of nanofibers implied full incorporation into nanofibers while the results of differential scanning calorimetry revealed the absence of crystalline carvedilol for all formulation. Spectra of nanofibers measured by infrared spectroscopy (with fast Fourier transform) revealed absence of characteristic peaks of carvedilol. Dissolution rate Soluplus<sup>®</sup> nanofibers with carvedilol was higher relative to the crystalline form of pure carvedilol.

In the third part, the goal was the development of tablet formulation with instant release of carvedilol prepared by direct compression. Dissolution rates of carvedilol from tablets prepared from conventional excipients were compared to those determined for tablets prepared by compressing Soluplus<sup>®</sup> nanofibers with carvedilol. Significant differences

were observed only during the first 15 min of dissolution test, where faster dissolution rates were observed for tablets prepared by compressing nanofibers. The total amount of dissolved carvedilol at the end of dissolution test was approximately the same for all the formulations.

The fourth part of research was dedicated to the development of tablet formulations with delayed release of carvedilol that were prepared by compression coating while using statistical methodology of design of experiments (DOE) and *Failure mode and effect analysis* (FMEA) risk assessment technique. Critical material and process parameters (CMPs and CPPs, respectively) were defined as well as their potential deviations that could influence critical quality attributes (CQAs) of compression coated tablets. FMEA analysis pointed to many factors that can significantly influence critical quality attributes and which should be kept under control. Three full factorial  $2^2$  experimental design sets were performed. In the first set the influence of superdisintegrants (sodium starch glycolate, SSG, and croscopolone, CP), added to the tablet core, and polymer concentration (polyethylene oxide, Polyox WSR N60K), present in the tablet coating layer, on CQAs was estimated. Results showed statistically significant influence of polymer concentration on the duration of time delay of carvedilol tablets' dissolution (*lag time*) where increase of polymer concentration lead to prolongation of the *lag time* from 2.5h to 4h. The amount of released carvedilol was significantly influenced by the type of superdisintegrant. For the polymer concentrations of 30% and 35% in the tablet coat, 1.5h after *lag time*, 45% and 30% of carvedilol was released when SSG was used while 30% and less than 10% was released in case of CP, respectively. In the second set of full factorial DOE experiments, the influence of sodium chloride concentration and SSG on critical quality attributes was assessed while in the third set, the influence of mannitol and Polyox WSR N60K concentration was investigated. Results revealed that the addition of sodium chloride or mannitol to tablet core significantly affects the total amount of released carvedilol while *lag time* is significantly influenced by sodium chloride only. Compression coated tablets containing nanofibers in tablet core and formulations containing 10% of sodium chloride showed the fastest carvedilol release. During 1h, after *lag time*, 64 and 67% of carvedilol were released from these two formulations, respectively. The difference between them was in the length of *lag time*, where formulation with sodium chloride in the tablet core showed 4, and formulation with nanofibers 2.5h. Examination of carvedilol dissolution profiles of compression coated tablets demonstrated that using compression coating is a suitable method to achieve delayed release from tablet cores, while the incorporation of nanofibers in the tablet cores provides the better alternative than the addition of superdisintegrants and mannitol in order to achieve faster release of carvedilol.

*Key words: carvedilol, miscibility, electrospinning, compression coating technique, pulsatile release.*

## Sadržaj

1.0	Opšti deo .....	1
1.1	Uvod .....	1
1.2	Farmaceutski razvoj.....	6
1.2.1	Upravljanje rizicima .....	8
1.2.2	Analiza efekata u slučaju neizvršenja-FMEA .....	10
1.3	Farmaceutski preparati sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance i hronoterapijski sistemi.....	12
1.3.1	Pulsno oslobađanje lekovite supstance .....	14
1.3.2	Hronoterapijski sistemi .....	14
1.4	Primena čvrstih disperzija u poboljšanju rastvorljivosti i brzine rastvaranja teško rastvorljivih lekovitih supstanci .....	17
1.4.1	Karvedilol.....	17
1.4.2	Karakteristike amorfnih čvrstih disperzija .....	18
1.4.3	Soluplus® .....	19
1.4.4	Procena stepena mešanja lekovite supstance i polimera .....	20
1.4.5	Kvalitativne metode.....	21
1.4.6	Kvantitativne metode.....	23
1.5	Primena tehnike elektropredenja za dobijanje nanovlakana .....	26
1.5.1	Polimerna nanovlakna.....	27
1.5.2	Karakterizacija polimernih nanovlakana .....	29
1.6	Oblaganje kompresijom .....	32
2.0	Cilj istraživanja .....	34
3.0	Eksperimentalni deo .....	35
3.1	Materijali .....	35
3.2	Metode .....	36
3.2.1	Procena stepena mešanja.....	36
3.2.2	Elektropredenje.....	40
3.2.3	Razvoj formulacije tableta obloženih kompresijom .....	44
4.0	Rezultati i diskusija .....	53
4.1	Određivanja stepena mešanja karvedilola i Soluplus®-a .....	53
4.2	Dobijanje nanovlakana Soluplus®-a impregniranih karvedilolom.....	60
4.3	Formulacija tabletnih jezgara .....	72
4.4	Izrada i karakterizacija tableta obloženih kompresijom .....	74
5.0	Zaključak .....	94



6.0	Literatura.....	99
7.0	Biografija autora.....	107

## 1.0 Opšti deo

### 1.1 Uvod

Farmaceutski razvoj (engl. *Pharmaceutical Development*) obuhvata proces dizajniranja proizvoda odgovarajućeg kvaliteta i razvoj procesa proizvodnje koji će konzistentno obezbeđivati odgovarajuće karakteristike proizvoda [ICH Q8(R2), 2009]. Dizajniranje kvaliteta (engl. *Quality by design - QbD*) podrazumeva da se kvalitet „ugrađuje“ u proizvod tokom farmaceutskog razvoja, definisanjem uticaja kritičnih atributa materijala i kritičnih procesnih parametra na prethodno definisane attribute kvaliteta proizvoda [Xie i sar., 2008; Lionberger i sar., 2008].

Vrlo je važna primena QbD koncepta u farmaceutskom razvoju preparata sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance, budući da je kod ovakvih preparata veliki broj kritičnih atributa materijala i kritičnih procesnih parametara koji mogu uticati na modifikovano oslobađanje lekovite supstance. U poslednjoj deceniji vrlo je aktuelan razvoj preparata sa pulsним oslobađanjem lekovite supstance, kod kojih se nakon određenog vremena odlaganja (engl. *lag time*) postiže trenutno oslobađanje lekovite supstance, što predstavlja jedan od mogućih pristupa u razvoju hronoterapijskih sistema [Bussemer i sar., 2001]. Oslobađanje lekovite supstance nakon odgovarajućeg vremena odlaganja može biti kompletno, u obliku jednog pulsa ili podeljeno, tj. više pulseva. Ovakvi preparati su posebno značajni za terapiju bolesti koje pokazuju cirkadijalnu zavisnost simptoma, kao što su astma, reumatoidni artritis ili bolesti kardiovaskularnog sistema [Youan, 2004; Mandal i sar., 2010]. Simptomi ovih bolesti pogoršavaju se tokom noći, ili ranih jutarnjih časova, tako da je neophodno da pacijent uzima dozu leka tokom noći, što smanjuje komplijansu. Primenom hronoterapijskih sistema poboljšava se terapijski ishod i komplijansa pacijenata zbog oslobađanja i dejstva lekovite supstance tačno tada kada je neophodno, tj. u trenutku kada su simptomi bolesti najizraženiji, kao i zbog prihvatljivijeg režima doziranja [Youan, 2004]. Hronoterapijski sistemi mogu biti formulisani kao obložene tablete koje se sastoje iz tabletnog jezgra, koje sadrži aktivnu supstancu, i omotača koji kontroliše oslobađanje lekovite supstance [Maroni i sar., 2010;

Lin i Kawashima, 2012]. Pulsno oslobađanje podrazumeva da se nakon definisanog vremena odlaganja lekovita supstanca trenutno oslobodi, što može predstavljati problem za teško rastvorne lekovite supstance [Bussemer i sar., 2001]. Postoji više načina za prevazilaženje slabe rastvorljivosti lekovite supstance koji su istraživani. Neki od njih su: formiranje soli, proleka, smanjenje veličine čestica, formiranje kompleksa, micela, mikroemulzija, nanoemulzija, nanosuspenzija, čvrstih lipidnih nanočestica, kao i čvrstih disperzija [Vo i sar., 2013]. Kroz mnoga istraživanja pokazane su mnogobrojne prednosti čvrstih disperzija u poboljšanju rastvorljivosti i brzine rastvaranja teško rastvornih lekovitih supstanci [Van den Mooter, 2012]. Ove prednosti uključuju smanjenje veličine čestica (često na nano nivo), poboljšanje mogućnosti kvašenja, poroziteta, kao i izmenu kristalne forme lekovite supstance, što uglavnom podrazumeva njenog prevođenje u amorfno stanje [Alam i sar., 2012; Prabhu i sar., 2005; Vasconcelos i sar., 2007]. Budući da se za pripremu čvrstih disperzija mogu koristiti različite pomoćne supstance, kao što su polimeri, potrebno je proceniti stepen mešanja lekovite supstance sa odabranim polimerom, kao i stepen disperziteta i međusobne interakcije u dobijenom sistemu. Poznato je da je stepen mešanja lekovite supstance i polimera veoma važan, kako za povećanje rastvorljivosti tako i za formiranje fizički stabilnog amorfnog sistema [Meng i sar., 2015; Greenhalgh i sar., 1999]. Postoji više kvalitativnih i kvantitativnih metoda za procenu stepena mešanja lekovite supstance i polimera određivanjem i analizom odgovarajućih termodinamičkih parametara [Marsac i sar., 2009, Hansen, 2007].

Postoji više metoda za dobijanje čvrstih disperzija sa ciljem prevazilaženja problema rastvorljivosti lekovitih supstanci [Babu i sar., 2010]. Elektropredenje (engl. *electrospining*) predstavlja jednu od metoda uparavanja rastvarača koja se koristi za dobijanje čvrstih disperzija, tj. vlakana nanometarskih ili mikrometarskih dimenzija. Radi se o energetski efikasnom postupku dobijanja čvrstih disperzija nanometarske veličine [Vo i sar., 2013]. To je tehnika dobijanja nanovlakana iz viskoelastičnog rastvora ili rastopa polimera primenom visokog napona [Potrč i sar., 2015]. U ovoj metodi, rastvor lek-polimer se smešta u špric povezan sa mikro pumpom i primenjuje se visok napon (između 5 i 30 kV) na vrh igle kako bi se indukovalo naelektrisanje na površini rastvora. Takođe, duž konstantnog rastojanja između vrha igle i kolektora primenjuje se konstantan električni potencijal. Kada električna sila prevaziđe površinski napon rastvora na mestu kontakta sa vazduhom, mlaz polimera biva izbačen [Vo i sar., 2013]. Ovim postupkom

se dobijaju ultrafina vlakna ili vlaknaste strukture malih dijametara korišćenjem različitih polimera. Na osnovu trenutnih podataka iz literature, prepoznato je nekoliko prednosti korišćenja polimernih nanovlakana dobijenih elektropredenjem kao nosača lekovite supstance. Zahvaljujući velikom odnosu površine i volumena, polimerna nanovlakna obezbeđuju adekvatno oslobađanje lekovitih supstanci koje pripadaju klasi II prema Biofarmaceutskom sistemu klasifikacije, koje imaju nisku rastvorljivost i visoku permeabilnost (engl. *Biopharmaceutical system of classification - BCS*) [Yu i sar., 2009]. Nanovlakna su korišćena kao nosači koji obezbeđuju veoma brzo rastvaranje lekovite supstance, ali profili oslobađanja mogu lako biti modifikovani, radi postizanja produženog, odloženog ili pulsog oslobađanja lekovite supstance, ne samo različitim sastavom formulacije već i modifikovanjem morfologije i mikrostrukture nanovlakana kao i procesnih parametara [Ignatious i Baldoni, 2003]. Na proces elektropredenja i karakteristike dobijenih vlakana mogu uticati atributi materijala i procesni parametri. Atributi materijala su vrsta i molekulska masa polimera, raspodela molekulske mase polimera i njegova struktura (linearna ili razgranata), karakteristike rastvora polimera (koncentracija, viskozitet, provodljivost, dielektrična konstanta, površinski napon, naelektrisanje spinovanog mlaza), dok su najznačajniji procesni parametri električni potencijal, protok rastvora/rastopa za elektropredenje, dimenzije i karakteristike uređaja, ambijentalni parametri (temperatura, vlažnost i brzina vazduha) [Pelipenko i sar., 2015]. Variranjem jednog ili više navedenih parametara, nanovlakna mogu biti uspešno dobijena elektropredenjem različitih materijala, kao što su celuloza, pirolidon, polietilenoksidni polimeri, biopolimeri (kolagen), DNK, proteini (elastin), kompoziti i relativno mali molekuli kao što su fosfolipidi [Pelipenko i sar., 2015]. Veliki broj polimera različitih karakteristika je uspešno korišćen za dobijanje nanovlakana elektropredenjem, što govori o velikoj mogućnosti primene ove tehnike [Ramakrishna, 2005]. Vrlo je značajna mogućnost da elektropredena nanovlakna mogu biti dalje formulisana, određenim postupkom mlevenja, tj. usitnjavanja, u čvrste farmaceutske oblike, kao što su tablete. Poller i saradnici [2017] su formulisali minitablete kompresijom nanovlakana povidona impregniranih prednizonom, u cilju procene mogućnosti njihove upotrebe za oralni put primene, ali još uvek je veoma malo podataka o tabletama dobijenim kompresijom usitjenih elektropredanih nanovlakana što predstavlja novi izazov u istraživanju [Poller i sar., 2017; Démuth i sar., 2015; Démuth i sar., 2017].

U cilju postizanja pulsno oslobađanja, na tabletno jezgro sa lekovitom supstancom nanosi se omotač koji može da obezbedi odlaganje oslobađanja lekovite supstance u određenom vremenskom periodu [Lin i Kawashima, 2012]. Hronoterapijski sistemi najčešće zahtevaju viščasovno odlaganje oslobađanja lekovite supstance, zbog čega je potrebno formulirati odgovarajući omotač i odabrati postupak njegovog nanošenja. Jedna od tehnika oblaganja koja se često koristi jeste oblaganje kompresijom. Poznata je i kao dvostruka kompresija ili suva kompresija, ne zahteva upotrebu rastvarača, relativno je kratkotrajan proces, i moguće je obložiti tabletno jezgro veće mase nego kod tehnika za oblaganje uz korišćenje rastvarača, a takođe je moguće naneti veći sloj obloge što je vrlo značajno sa aspekta viščasovnog odloženog oslobađanja [Ozeki i sar., 2004]. Tablete obložene kompresijom uobičajeno sadrže jezgro sa trenutnim oslobađanjem lekovite supstance, i omotač, nanet kompresijom (tableta unutar tablete). Jezgro se može dobiti direktnom kompresijom smeše praškova, granulata ili smeše samlevenih nanovlakana. Omotač oko jezgra najčešće sadrži polimer koji modifikuje oslobađanje i, po potrebi, sredstvo za dopunjavanje. Omotač može da vrši kontrolu vremena i/ili brzine rastvaranja lekovite supstance [Lin i Kawashima., 2012; Lin i sar., 2002]. Postoji veliki broj faktora koji mogu uticati na oslobađanje lekovite supstance iz tableta obloženih kompresijom koji potiču od tabletnog jezgra i od omotača tableta [Halsas i sar., 1998]. Pri formulaciji tabletnog jezgra potrebno je razmotriti rastvorljivost lekovite supstance, masu jezgra, izbor pomoćnih supstanci, kao i silu kompresije koju je potrebno primeniti. Prilikom formulacije tabletnog omotača potrebno je sagledati vrstu i molekulsku masu odabranog polimera, masu i debljinu omotača, poziciju jezgra, silu kompresije pri oblaganju, itd [Lin i Kawashima, 2012]. Imajući u vidu veliki broj formulacionih i procesnih parametara u formulaciji ovih preparata, radi lakšeg razumevanja i obezbeđenja kvaliteta u okviru QbD koncepta, neophodno je primeniti različite alate, kao što su analiza rizika, eksperimentalni dizajn ili veštačke neuronske mreže. Analizu rizika moguće je vršiti primenom različitih tehnika predloženih u ICH Q9 smernici sa ciljem da se identifikuju, procene, analiziraju i kontrolišu faktori koji mogu uticati na kvalitet proizvoda [ICH Q9, 2005]. Jedna od tehnika koja može biti korišćena je Analiza efekata u slučaju neizvršenja (engl. *Failure Mode and Effects Analysis-FMEA*). Ova tehnika podrazumeva analizu i rangiranje rizika povezanih sa različitim tipovima neusaglašenosti proizvoda (procesa), pri čemu se izdvajaju oni sa većim rizikom po kvalitet proizvoda kako bi se sprovele korektivne mere

[Barends i sar., 2012]. Upotreba statističkih metoda u planiranju eksperimenata, kao što je eksperimentalni dizajn, omogućava efikasniji razvoj formulacija i dovodi do boljih i pouzdanijih zaključaka. Eksperimentalni dizajn je skup matematičkih i statističkih tehnika koji omogućava sistematičnu i istovremenu evaluaciju uticaja više kontrolisanih ulaznih promenljivih (procesnih ili formulacijskih) na određene izlazne parametre [Armstrong, 2006].

## 1.2 Farmaceutski razvoj

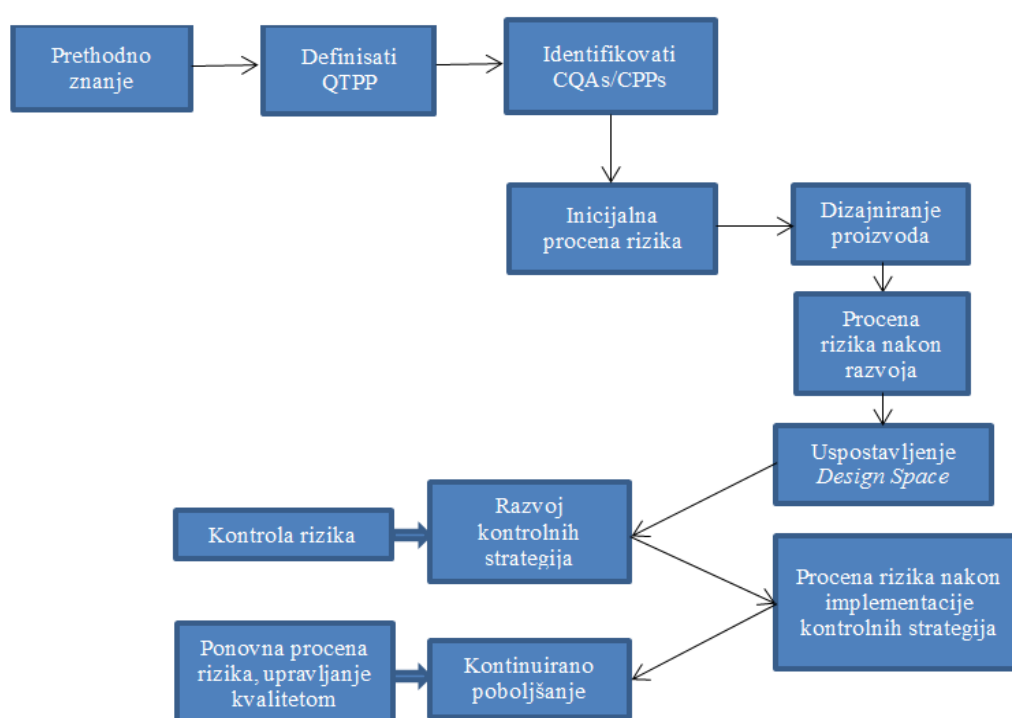
Farmaceutski razvoj obuhvata: definisanje ciljnog profila kvaliteta proizvoda (engl. *Quality Target Product Profile-QTTP*), koji se odnosi na karakteristike proizvoda koje, ukoliko su u zadatim granicama, obezbeđuju kvalitet, bezbednost i efikasnost gotovog proizvoda; kao i identifikaciju kritičnih atributa kvaliteta proizvoda [Lionberger i sar., 2008; ICH Q8(R2), 2009].

Tradicionalni pristup farmaceutskom razvoju podrazumeva da je kvalitet proizvoda uglavnom obezbeđen ograničavanjem fleksibilnosti u procesu proizvodnje, i testiranjem gotovog proizvoda, na kraju procesa, tzv. testiranjem kvaliteta (engl. *Quality by testing, QbT*) [Lawrence, 2008]. Savremeni, QbD pristup farmaceutskom razvoju, je naučno zasnovan, holistički i proaktivan sa odgovarajućim kontrolnim strategijama. Ovaj pristup podrazumeva da se kvalitet ugrađuje u proizvod tokom farmaceutskog razvoja što olakšava razumevanje uticaja kritičnih faktora, poput kritičnih atributa materijala i procesnih parametara, na prethodno definisane attribute kvaliteta proizvoda [Xie i sar., 2008; Lionberger i sar., 2008]. Informacije i znanja koja se dobijaju u toku studija farmaceutskog razvoja, kao i iskustvo tokom procesa proizvodnje, obezbeđuju naučno zasnovanost za uspostavljanje prostora za dizajniranje kvaliteta (engl. *Design space-DS*), specifikacija i sistema za kontrolu proizvodnje [ICH Q8(R2), 2009]. DS predstavlja multidimenzionalnu kombinaciju i interakcije ulaznih promenljivih (npr. atributa materijala) i procesnih parametara koji je formiran kako bi se osigurao kvalitet proizvoda. Rad unutar DS-a se ne smatra promenom, dok se rad izvan ovih okvira smatra promenom, i normalno inicira regulatorni proces postregistracionih izmena [ICH Q8(R2), 2009].

Informacije koje se dobijaju u okviru farmaceutskog razvoja, predstavljaju osnovu za upravljanje rizicima. Potrebe za promenama u formulaciji proizvoda i/ili procesima proizvodnje tokom razvoja, ili životnog ciklusa proizvoda, bi trebalo posmatrati kao prilike za sticanje dodatnih saznanja koja će pružiti podršku uspostavljanju DS-a. Takođe, veoma je značajno sagledati i relevantna saznanja dobijena iz eksperimenata koji su dali neočekivane rezultate. Da bi se iskoristila dodatno prikupljena saznanja, može biti korisno korišćenje alata za upravljanje rizicima [ICH Q8(R2), 2009; ICH Q9, 2005]. Procena rizika je naučno zasnovana procedura u upravljanju rizicima koja može pomoći

identifikaciji atributa materijala i procesnih parametara koji imaju uticaj na kritične attribute kvaliteta proizvoda. Procena rizika se vrši u ranoj fazi procesa farmaceutskog razvoja i ponavlja se kada više informacija postane dostupno i kada se stekne više znanja. Alati za procenu rizika se mogu koristiti za identifikovanje i rangiranje parametara (proces, materijala, ulaznih parametara) koji imaju potencijal da utiču na kvalitet proizvoda, i to zahvaljujući prethodnom iskustvu ili eksperimentalnim podacima [ICH Q9, 2005].

Primena QbD koncepta u farmaceutskom razvoju prikazana je na slici 1.



Slika 1. QbD, upravljanje rizikom i upravljanje kvalitetom u razvoju formulacije (preuzeto i prilagođeno iz ICH Q8(R2), 2009)

Regulatorni zahtevi navedeni u ICH smernicama Q8(R2) Farmaceutski razvoj, ICH Q9 Upravljanje rizicima i ICH Q10 Farmaceutski sistem kvaliteta, postavljeni su kako bi se obezbedio kvalitet farmaceutskog proizvoda i obezbedila regulatorna fleksibilnost sa ciljem poboljšanja procesa proizvodnje farmaceutskih preparata. Slika 1 pokazuje neophodne korake za razvoj novog proizvoda primenom QbD koncepta. Prvi korak je definisati QTPP [ICH Q8(R2), 2009; ICH Q9, 2005; ICH Q10, 2008]. ICH Q8(R2)

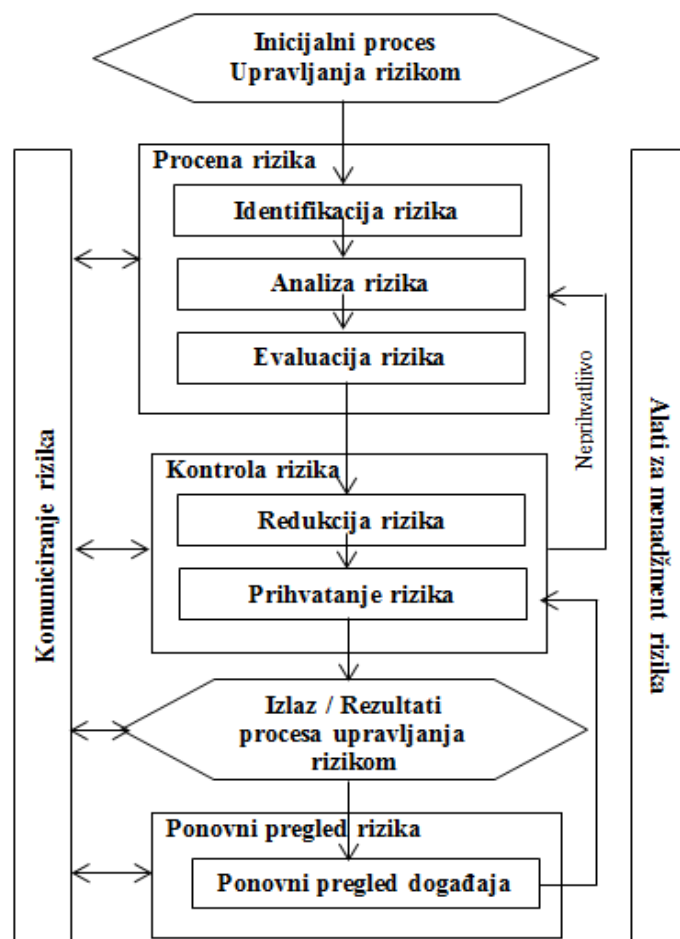


definiše QTPP kao sumu svih karakteristika kvaliteta proizvoda koji bi bili idealni za obezbeđenje željenog kvaliteta, uzimajući u obzir bezbednost i efikasnost proizvoda. Drugim rečima, moraju biti određeni odgovarajući atributi, koji moraju biti dizajnirani u farmaceutski oblik, kako bi se postigli željena svojstva (atributi kvaliteta) proizvoda. Ti određeni atributi mogu uključivati faktore kao što su terapijska doza, put primene, farmaceutski oblik, profil oslobađanja koji odgovara farmakokinetičkim karakteristikama lekovite supstance i optimizuje njenu isporuku [ICH Q8(R2), 2009]. Nakon definisanja QTPP, i razvoja optimalne formulacije i procesa proizvodnje, sledeći korak je određivanje kritičnih atributa kvaliteta proizvoda (engl. *Critical quality attributes-CQAs*). CQAs predstavlja fizičke, hemijske, biološke ili mikrobiološke karakteristike koje bi trebalo da budu u odgovarajućim granicama, kako bi se obezbedio odgovarajući kvalitet proizvoda. CQAs su obično povezane sa lekovitom supstancom, ekscipijensima, intermedijerima (in-procesnim materijalima) i proizvodom [ICH Q8(R2), 2009]. Primeri CQAs uključuju one karakteristike koje su od značaja za čistoću proizvoda, jačinu, oslobađanje leka i stabilnost. Za čvrste farmaceutske oblike, karakteristike proizvoda kao što su raspodela veličine čestica, nasipna gustina, i sadržaj vlage mogu biti primeri CQAs koji mogu uticati na kvalitet finalnog proizvoda. Glavni cilj QbD pristupa jeste da se identifikuju najznačajnije CQAs, kroz povezivanje kritičnih atributa materijala (engl. *Critical material attributes-CMAs*) i kritičnih procesni parametara (engl. *Critical process parameters-CPPs*), koji imaju veliki uticaj na QTPP, i da se objasni njihova veza sa kvalitetom proizvoda [ICH Q8(R2), 2009]. Jedan od načina na koji se može optimizovati korišćenje informacija u toku razvoja jeste primena postupaka upravljanja rizicima, da bi se dali prioriteta određenim varijablama koje će dalje biti ispitivane. Cilj je identifikovati varijable koje predstavljaju najveći rizik za kvalitet proizvoda i ispitivati ih mnogo pažljivije [ICH Q8(R2), 2009; ICH Q9, 2005].

### **1.2.1 Upravljanje rizicima**

Principi procene rizika su efikasno korišćeni u mnogim oblastima biznisa, finansija, osiguranja javnog zdravlja, farmakovigilance, kao i u agencijama koje regulišu pomenute industrije. Takođe, značaj sistema kvaliteta prepoznat je u farmaceutskoj industriji i postalo je evidentno da je upravljanje rizicima značajna komponenta za efikasan sistem kvaliteta [ICH Q9, 2005]. Proizvodnja i upotreba leka, uključujući njegove lekovite i

pomoćne supstance, nužno nose sa sobom određeni stepen rizika. Rizik po kvalitet proizvoda predstavlja samo jednu komponentu opšteg rizika. Model za upravljanje rizicima predstavljen je na slici 2. Takođe, mogu biti korišćeni i drugi modeli [ICH Q9, 2005].



Slika 2. Šematski prikaz procesa upravljanja rizikom (preuzeto iz ICH Q9, 2005)

Procena rizika se sastoji od identifikacije opasnosti i analize i evaluacije rizika povezanih sa izlaganjem tim opasnostima. Analiza rizika predstavlja procenu rizika povezanih sa identifikovanim opasnostima/hazardima. To je kvalitativni ili kvantitativni proces povezivanja verovatnoće događaja i ozbiljnosti posledica, a neretko uključuje i procenu mogućnosti detekcije. Evaluacija rizika podrazumeva poređenje identifikovanih i analiziranih rizika u odnosu na postavljene kriterijume. Izlazni podaci u proceni rizika su

ili kvantitativne procene rizika ili kvalitativni opis opsega rizika [ICH Q9, 2005]. Kada su rizici izraženi kvantitativno, koristi se numerička verovatnoća. U drugom slučaju, rizik može biti izražen korišćenjem kvalitativnih deskriptora, kao što su „visok“, „srednji“ i „nizak“ što bi trebalo da bude objašnjeno što je detaljnije moguće [ICH Q9, 2005]. Kontrola rizika podrazumeva donošenje odluke za smanjenje ili prihvatanje rizika, ili u slučajevima kada je rizik previsok, strategija podrazumeva odustajanje od aktivnosti. Takođe je moguće i prenošenje rizika. Svrha kontrole rizika jeste da redukuje rizike na prihvatljiv nivo. Mere koje se upotrebljavaju za kontrolu rizika, treba da budu srazmerne značaju tog rizika. Smanjenje rizika može da obuhvati aktivnosti koje se preduzimaju kako bi se kontrolisala ozbiljnost i verovatnoća posledica [ICH Q9, 2005].

### **1.2.2 Analiza efekata u slučaju neizvršenja-FMEA**

FMEA (engl. *Failure mode and effect analysis*), analiza efekata u slučaju neizvršenja, podrazumeva analizu i rangiranje rizika povezanih sa različitim tipovima odstupanja proizvoda (procesa) od prethodno postavljenih zahteva kvaliteta, izdvajajući one sa većim prioritetom, koje pomoću korektivnih mera želimo dovesti na odgovarajući nivo [Kenneth, 2004]. FMEA je alat koji je često korišćen u aeroindustriji, automobilskoj i elektroindustriji [Van Leeuwen i sar., 2009].

FMEA je naročito korisna u evaluaciji novog procesa ili proizvoda, što je bitno u procesu farmaceutskog razvoja, kada je između ostalog, potrebno izvršiti analizu rizika u cilju identifikacije i kategorizacije faktora (CMA, CPP) koji dovode do odstupanja u QTPP [ICH Q9, 2005]. Može se upotrebiti pre implementacije nekog procesa, u cilju procene potencijalnih neizvršenja i njihovog uticaja na QTPP, a može biti korišćena za procenu uticaja neke predložene promene već postojećeg procesa, na primer za potrebe proširenja DS-a [Fahmy i sar., 2012; Gupta i sar., 2013]. Fahmy i saradnici su pokazali primenu FMEA u razvoju formulacije i procesa dobijanja tableta ciprofloksacin-hidrohlorida, gde su analizom rizik identifikovani i kategorisani glavni faktori koji mogu uticati na DS [Fahmy i sar., 2012]. Van Leeuwen i saradnici su opisali primenu FMEA na NIR analitičku proceduru u okviru analitičke validacije kao sastavnog dela farmaceutske proizvodnje (engl. *Near-infrared analytical procedure*) [Van Leeuwen i sar., 2009]. Neke jednostavne tehnike se često koriste za organizaciju podataka, strukturano upravljanje

rizicima i olakšavanje donošenja odluka putem nekoliko alata kao što su *flowcharts*, *Ishikawa* dijagram (*fish-bone* dijagram), mapiranje procesa itd. [ICH Q9, 2005].

U poslednje vreme se u oblasti farmacije, povećava primena ovog alata za analizu rizika, za razvoj procesa proizvodnje farmaceutskih preparata, u upravljanju rizicima zdravstvene zaštite, i validaciji analitičkih metoda [Bonnabry i sar., 2005]. U oblasti obezbeđenja kvaliteta lekova, korist ove analize je očigledna i u ICH smernicama je navedeno da je FMEA jedna od mogućih alatki za upravljanje rizicima [ICH Q9, 2005].

Već je napomenuto da je prvi korak u izvođenju FMEA identifikacija potencijalnih odstupanja od postavljenih zahteva kvaliteta. Nakon definisanja odstupanja, pri čemu jedno odstupanje, tj. neizvršenje može imati više uzroka, što mora biti definisano, dodeljuju im se odgovarajući skorovi na osnovu tri aspekta svakog odstupanja: verovatnoća događanja, odnosno pojave neusaglašenosti (engl. *Occurrence-O*), ozbiljnosti te neusaglašenosti (engl. *Severity-S*), i mogućnosti njene detekcije (engl. *Detectability-D*) [Barends i sar., 2012]. Tradicionalno, ovo dodeljivanje skorova se odvija dodeljivanjem diskretnih vrednosti svakoj stavci na osnovu prethodno definisane skale. Kategorički skorovi se rangiraju tako što se viši skorovi povezuju sa višim rizikom, a rizik se računa kao konačna ocena rizika (engl. *Risk priority number-RPN*), koji je proizvod vrednosti ova tri parametra (jednačina 1) [Barends i sar., 2012].

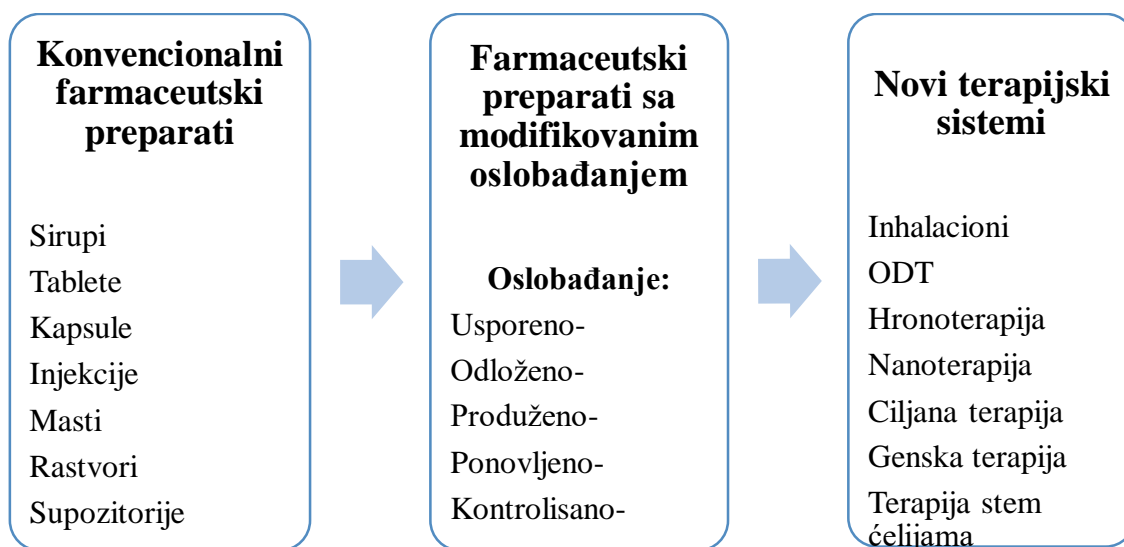
$$RPN = O \times D \times S \quad (1)$$

Ove RPN vrednosti omogućavaju poređenje rizika: odstupanja sa najvećim RPN skorovima su najurgentnija za korigovanje sa ciljem smanjenja ovih rizika [Fahmy i sar., 2012; Vora i sar., 2013; Barends i sar., 2012; Gupta i sar., 2013].

Sve tri promenljive koje se koriste za izračunavanje RPN vrednosti su posebno definisane i imaju skale različitog opsega, definisane prema individualnim slučajevima [Gupta i sar., 2013]. Fahmy i saradnici su ispitivali primenu FMEA kao jedan od alata u identifikaciji glavnih formulacionih i procesnih faktora u DS za tablete sa trenutnim oslobađanjem ciprofloksacin-hidrohlorida. Definisali su skale istog opsega za sve tri promenljive, od 1 do 5 [Fahmy i sar., 2012]. Dok su sa druge strane Barends i saradnici, koristeći FMEA za analizu rizika u NIR analitičkoj proceduri, sve tri promenljive definisali skalama od 1 do 10 [Barends i sar., 2012].

### 1.3 Farmaceutski preparati sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance i hronoterapijski sistemi

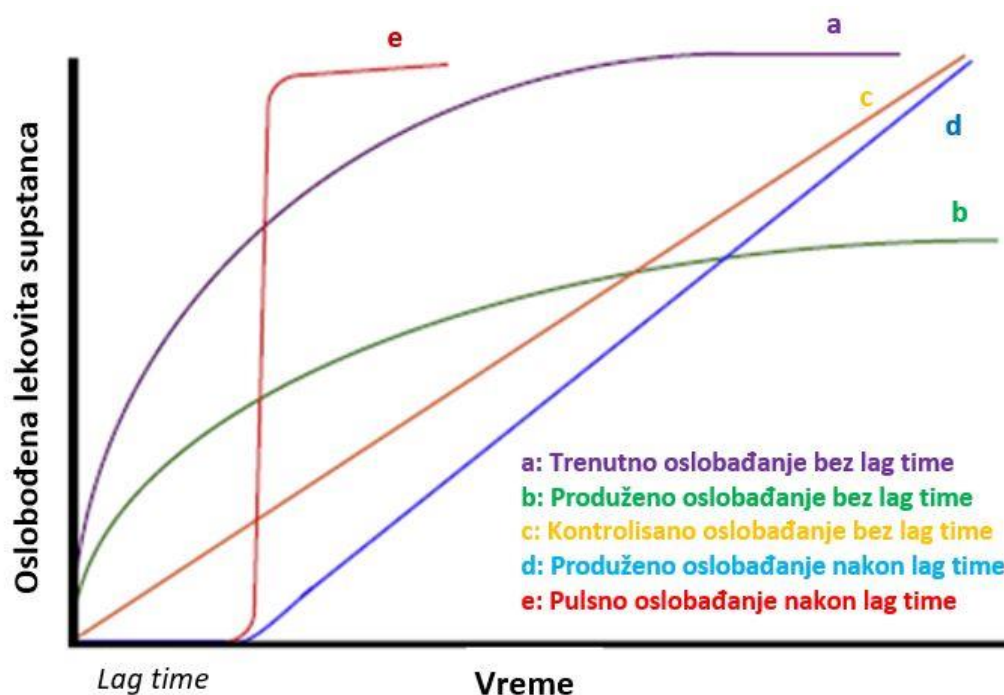
Tokom poslednjih decenija veliki je porast interesovanja za razvoj novih preparata upravo zbog napretka i razvoja u tehnološkom smislu. Istraživanja su sve više okrenuta razvoju efikasnijih preparata sa već postojećim aktivnim supstancama, nego ka otkriću novih [Lin i Kawashima, 2012]. Konvencionalni farmaceutski oblici obezbeđuju trenutno, odnosno brzo oslobađanje lekovite supstance i neretko zahtevaju ponovljenu primenu leka. Upravo zbog potrebe za učestalim doziranjem, pojave neželjenih efekata, smanjenja ili izostanka efikasnosti i neodgovarajuće komplijanse pacijenata, ove konvencionalne farmaceutske preparate sve više menjaju farmaceutski preparati sa modifikovanim oslobađanjem lekovite supstance (slika 3) [Lin i Kawashima, 2012].



Slika 3. Proces razvoja farmaceutskih preparata (preuzeto i prilagođeno iz Lin i Kawashima., 2012).

Preparati sa modifikovanim oslobađanjem su preparati kod kojih je brzina i/ili mesto oslobađanja lekovite supstance modifikovana u odnosu na konvencionalne farmaceutske oblike sa istim načinom primene. Modifikovano oslobađanje postiže se specifičnim sastavom formulacije i/ili specifičnim proizvodnim postupkom [Ph. Eur. 9.0].

Kombinacijom različitih farmaceutskih oblika za modifikovano oslobađanje supstance, mogu se dobiti različiti profili oslobađanja lekovite supstance, koji zavise od farmakoterapijske namene preparata i svojstava lekovite supstance (slika 4) [Lin i Kawashima, 2012].



Slika 4. Različiti profili brzine rastvaranja lekovite supstance iz farmaceutskih oblika (preuzeto i prilagođeno iz Lin i Kawashima., 2012]

Nakon prevazilaženja nedostataka konvencionalnih farmaceutskih oblika, razvojem druge generacije, farmaceutskih oblika sa modifikovanim oslobađanjem, uočeno je da i ovi farmaceutski oblici ne mogu da obezbede adekvatno oslobađanje lekovite supstance u momentu egzacerbacije simptoma bolesti, odnosno brzina rastvaranja lekovite supstance iz ovih farmaceutskih oblika ne odgovara promenama u organizmu [Lin i Kawashima, 2012]. Oni obezbeđuju kontinuiranu terapiju neke bolesti, oslobađajući lekovitu supstancu konstantnom brzinom iz farmaceutskog preparata i postižući konstantnu koncentraciju lekovite supstance u krvi. Međutim, terapijski ishodi primene

ovih preparata često nisu zadovoljavajući. Dolazi do nedovoljno izraženog efekta kada je potrebna veća efikasnost preparata, na primer u trenutku pogoršanja simptoma bolesti. Iz tog razloga dolazi do razvoja treće generacije farmaceutskih preparata (slika 3).

### **1.3.1 Pulsno oslobađanje lekovite supstance**

Hronoterapija predstavlja koordinaciju bioloških ritmova sa medicinskim tretmanom i podrazumeva primenu odgovarajućih farmaceutskih preparata u tretmanu bolesti koje pokazuju određenu cirkadijalnu zavisnost. To je pristup zasnovan na isporuci leka u određeno vreme, prema patofiziološkim potrebama organizma u stanju bolesti [Lin i Kawashima, 2012; Youan, 2004]. Bolesti koje su pogodne za hronoterapiju su one za koje je utvrđeno dovoljno naučnih činjenica koje bi potvrdile opravdanost upotrebe hronoterapijskih sistema u odnosu na konvencionalnu terapiju [Mandal i sar., 2010]. Mnoge bolesti pokazuju cirkadijalnu zavisnost, što znači da pojava i intenzitet simptoma bolesti nisu konstantni u toku dana (artritis, astma, alergije, kardiovaskularne bolesti). Cirkadijalni ritam je jedan od bioloških ritmova, koji se razlikuju u dužini trajanja i regulišu nekoliko funkcija organizma kao što su metaboličke, fiziološke, zatim navike spavanja, proizvodnju hormona i dr. [Youan, 2004; Gest i sar., 2014]. Izbor odgovarajućeg režima doziranja može biti iskorišćen za poboljšanje ishoda terapije hroničnih bolesti [Lin i Kawashima, 2012; Ambedkar Sunil i sar., 2013]. Postoji obimni podaci u literaturi koji objašnjavaju racionalnost hronoterapije. Zaključeno je da se nedovoljno značaja pridaje činjenici da veliki broj bolesti pokazuje cirkadijalnu zavisnost, i zato je veliki broj mogućnosti za istraživanje u oblasti hronoterapijskih sistema, dok dizajniranje farmaceutskih oblika sa konstantnom brzinom rastvaranja lekovite supstance postaje manje privlačno [Mandal i sar., 2010].

### **1.3.2 Hronoterapijski sistemi**

Hronoterapijski sistemi su koncipirani tako da oslobađaju lekovitu supstancu u ritmu koji idealno odgovara zahtevima u stanju bolesti. Upravo zbog načina, tj. mesta i vremena oslobađanja lekovite supstance, ovi farmaceutski oblici su bezbedniji i efikasniji u odnosu na konvencionalne farmaceutske oblike [Lin i Kawashima, 2012]. Formulacijom hronoterapijskih sistema sa pulsним oslobađanjem, koje će odgovarati cirkadijalnom

ritmu simptoma u stanju bolesti, postiže se optimalna koncentracija leka u optimalno vreme, tako da se povećavaju terapijski, a smanjuju neželjeni efekti [Lin i Kawashima, 2012; Maroni i sar., 2010; Mandal i sar., 2010; Khan i sar., 2013; Ambedkar Sunil i sar., 2013].

Kod hronoterapijskih sistema, oslobađanje lekovite supstance najčešće predstavlja vremenski odloženo oslobađanje, što je u literaturi nazvano pulsem, otuda se često ovi sistemi nazivaju sistemima sa pulsним oslobađanjem lekovite supstance [Bussemer i sar., 2001]. Ovi preparati se koriste zbog već pomenutih prednosti, a takođe omogućavaju primenu lekovitih supstanci koje imaju izražen metabolizam prvog prolaza, kao i za istovremenu primenu inkompatibilnih supstanci [Lin i Kawashima, 2012].

Pulsni terapijski sistemi imaju više prednosti kao što su: predvidivo, reproducibilno i često kratko vreme zadržavanja leka u želucu, manja inter- i intraindividualna varijabilnost; povećana bioraspoloživost, smanjena neželjena dejstva i stvaranje tolerancije, povećana komplijansa, postizanje jedinstvenog profila oslobađanja (jedan ili više pulseva nakon definisanog *lag time*). Neki od nedostataka su smanjena reproducibilnosti i efikasnosti procesa proizvodnje, veliki broj procesnih varijabli, veliki broj koraka u formulaciji i potreba za naprednim tehnologijama [Maroni i sar., 2010; Mandal i sar., 2010; Rani i sar., 2013, Qiu i sar., 2016].

Oslobađanje lekovite supstance iz hronoterapijskih sistema može se kontrolisati omotačem različitog sastava koji se nanosi na jezgro tablete koje sadrži lekovitu supstancu [Maroni i sar., 2010]. Pored jednostavnosti dizajna i procesa proizvodnje, dostupnosti opreme i materijala potrebnih za njihovu proizvodnju, još jedna od prednosti jeste mogućnost formulisanja jezgra i omotača različitog sastava pri čemu se mogu dobiti različiti profili oslobađanja lekovite supstance. Omotači različitog sastava primenjuju se na jezgra koja sadrže lekovitu supstancu, i oni mogu da kontrolišu vreme početka oslobađanja lekovite supstance brzinom erozije omotača i brzinom penetracije vode kroz spoljašnji omotač, ili različitom debljinom omotača [Lin i Kawashima, 2012; Conte i sar., 1993]. Takođe, postoje osmotski sistemi koji se sastoje od jezgra, koje sadrži osmotski aktivnu supstancu i polupropustljive membrane. U kontaktu sa gastrointestinalnim tečnostima formira se osmotski pritisak unutar jezgra koji dovodi do pucanja omotača i oslobađanja lekovite supstance [Mandal i sar., 2010].



Sistemi kod kojih je oslobađanje lekovite supstance kontrolisano omotačem, u zavisnosti od sastava omotača, dele se na sisteme kod kojih dolazi do rastvaranja/erozije omotača, sistemi kod kojih dolazi do ruptуре omotača i sistemi kod kojih je pulsno oslobađanje zasnovano na promeni permeabilnosti omotača [Nainwal, 2012; Rani i sar., 2013]. Na tržištu se nalazi veći broj hronoterapijskih preparata za terapiju različitih bolesti i u tabeli 1, dati su neki primeri [Lin i Kawashima, 2012].

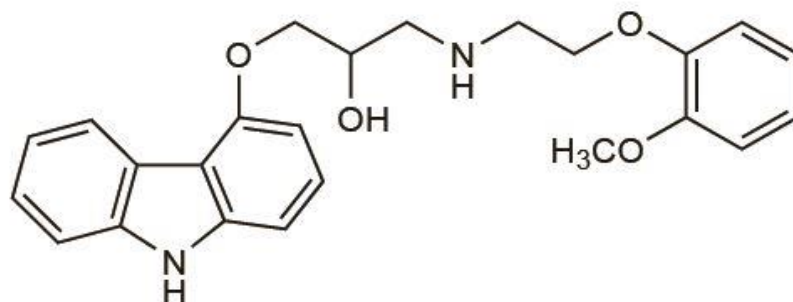
Tabela 1. Primeri hronoterapijskih sistema dostupnih na tržištu (preuzeto i prilagođeno iz Lin i Kawashima, 2012)

<b>Zaštićeno ime</b>	<b>Lekovita supstanca</b>	<b>Indikacija za hronoterapiju</b>
<i>Covera-HS</i>	Verapamil-hidrohlорid	Hipertenzija
<i>Uniphyl</i>	Teofilin	Astma
<i>Procardia XL</i>	Nifedipin	Angina pektoris/hipertenzija
<i>Lodotra</i>	Prednizon	Reumatoidni artritis
<i>Diamicron MR</i>	Gliklazid	Dijabetes tip II
<i>Coreg CR</i>	Karvedilol-fosfat	Srčana insuficijencija, Hipertenzija

## 1.4 Primena čvrstih disperzija u poboljšanju rastvorljivosti i brzine rastvaranja teško rastvorljivih lekovitih supstanci

Rastvorljivost lekovite supstance je jedna od najvažnijih fizičko-hemijskih osobina. Određivanje rastvorljivosti i pronalazak načina za njenu modifikaciju, ukoliko je to potrebno, su esencijalne komponente procesa farmaceutskog razvoja. Budući da rastvorljivost ograničava i primenu leka i farmaceutski razvoj, ispitivanje i istraživanje načina za poboljšanje rastvorljivosti predstavljaju značajan segment savremenih farmaceutskih istraživanja [Qiu i sar., 2016].

### 1.4.1 Karvedilol



Slika 5. Hemijska struktura karvedilola

Molekulska formula:  $C_{24}H_{26}N_2O_4$

Hemijski naziv: ( $\pm$ )-[3-(9H-karbazol-4-iloksi)-2-hidroksipropil][2-(2-metoksifenoksi)etil]amin

Molekulska masa: 406,474 [Ph. Eur. 9.0]

Osobine: beo ili skoro beo, kristalni prašak. Praktično nerastvorljiv u vodi, delimično rastvorljiv u alkoholu, praktično nerastvorljiv u razblaženim kiselinama [Ph. Eur. 9.0].

Upotreba: karvedilol je neselektivni antagonist  $\beta$  i  $\alpha_1$  adrenergičkih receptora i koristi se u terapiji hipertenzije i kongestivne srčane insuficijencije. Koristi se u pojedinačnim dozama od 3,125 do 25 mg [Drug Bank, carvedilol].

Karvedilol predstavlja racemsku smešu u kojoj neselektivnu aktivnost za blokadu  $\beta$ -adrenergičkih receptora ima S(-) enantiomer, dok i R(+) i S(-) enantiomeri imaju podjednaku aktivnost za blokadu  $\alpha$  adrenergičkih receptora. Blokiranje  $\beta$ -adrenergičkih receptora dovodi do smanjenja broja srčanih otkucaja, kontraktilnosti miokarda, i do smanjenja potreba miokarda za kiseonikom. Takođe, posredstvom svoje  $\alpha$  adrenergičke aktivnosti, dovodi do smanjenja sistemskog vaskularnog otpora. Karvedilol pokazuje polimorfizam i postoje njegova dva polimorfna oblika (I i II). Karvedilol u svojoj strukturi sadrži heterociklično jedinjenje i pripada grupi karbazola. Sadrži trociklični sistem, koji ima pirolon prsten povezan sa obe strane sa benzenovim prstenom [Drug Bank, carvedilol].

Karvedilol je slaba baza sa  $pK_a=7,8$  i  $\log P=3,8$  (oktanol/voda) [Loftsson i sar., 2008]. Prema Biofarmaceutskom sistemu klasifikacije, karvedilol se svrstava u klasu II (niska rastvorljivost – visoka permeabilnost). Karvedilol pokazuje pH zavisnu rastvorljivost: 832 mg/L u kiselj sredini (pH 1,2) i 5,8 mg/L na pH 7,8 [Hamed i sar., 2016]. Intestinalna permeabilnost iznosi  $1,94 \times 10^{-4}$  cm/s [Rasool i sar., 2015]. Zbog svojih fizičko-hemijskih i farmakoloških osobina, karvedilol je pogodna lekovita supstanca za formulaciju hronoterapijskih sistema [Greenberg i sar., 2006].

#### **1.4.2 Karakteristike amorfnih čvrstih disperzija**

Termin čvrste disperzije se odnosi na lekovitu supstancu u molekularnoj, amorfnoj ili mikrokristalnoj formi dispergovanu u nosač ili matriks u čvrstom stanju. Sam termin disperzije implicira da ne postoji mešanje faza. Ali, u farmaceustkoj literaturi, amorfne čvrste disperzije su slobodnije definisane i takođe uključuju sisteme gde je lekovita supstanca dispergovana u matriksu na molekulskom nivou (čvrsti rastvori). Nosači se obično sastoje iz polimera i mogu biti u kristalnom ili amorfnom obliku, ali nosači koji su u amorfnom obliku omogućavaju kompletno mešanje faza sa amorfnom lekovitom supstancom i time nude najviše prednosti za farmaceustku primenu [Qiu i sar., 2016]. Formulacija čvrstih disperzija se pokazala kao dobar pristup za poboljšanje rastvorljivosti, brzine rastvaranja i bioraspoloživosti lekovitih supstanci. Rastvorljivost i mogućnost kvašenja lekovite supstance u amorfnom stanju je poboljšana, što povećava brzinu njenog rastvaranja [Alam i sar., 2012].

Čvrste disperzije mogu biti pripremljene korišćenjem različitih procesa (postupaka) i metoda, kao što su sušenje raspršivanjem, kvašenje rastvaračem, uparavanje rastvarača, ekstruzija, liofilizacija, elektropredenje [Patel i sar., 2008; Hirasawa i sar., 2004; Garcia-Rodriguez i sar., 2011].

Kompleksnost dodatno povećava i činjenica da je za formiranje čvrstih disperzija moguće koristiti veliki broj nosača/polimera. Osim za povećanje brzine rastvaranja, tj. trenutno oslobađanje lekovite supstance, čvrste disperzije se takođe ispituju za formulaciju sistema sa kontrolisanim i usporenim oslobađanjem aktivne supstance [Alam i sar., 2012].

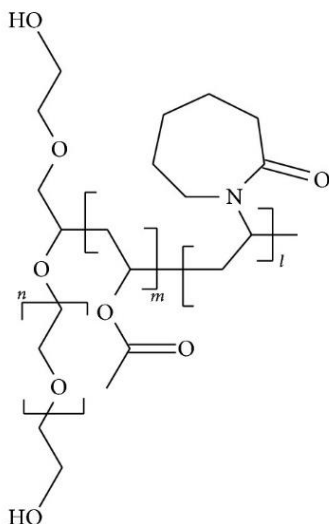
Postoji nekoliko faktora koji utiču na karakteristike čvrstih disperzija. Najvažnije su priroda lekovite supstance, tip nosača, metode i procesi pripreme čvrstih disperzija, veličina čestica lekovite supstance i udeo lekovite supstance u čvrstoj disperziji [Alam i sar., 2012; Kovačić i sar., 2011; Shimpi i sar., 2009]. Primeri hidrofilnih ekscipijenasa za pripremu čvrstih disperzija su polietilenglikol, povidon, hipromeloza (HPMC), poloksamer, laktoza. Nerastvorni u vodi i pH-nezavisni su porozna silika, natrijum-skrobglikolat, natrijum-karboksimetilceluloza, pregelatinizirani skrob. Noviji ekscipijensi kao što su Soluplus<sup>®</sup>, Neusilin<sup>®</sup>, Solumer<sup>®</sup> daju čvrste disperzije poboljšanih karakteristika, kao što su stabilnost, rastvorljivost i bioraspoloživost, i specijalno su dizajnirani upravo iz tih razloga [Alam i sar., 2012].

### **1.4.3 Soluplus<sup>®</sup>**

Soluplus<sup>®</sup> predstavlja polivinil kaprolaktam-polivinil acetat-polietilenglikol graft kopolimer. Ovaj kopolimer ima amfifilna svojstva i pogodan je za formiranje čvrstih disperzija sa teško rastvorljivim lekovitim supstancama jer je pokazano da omogućava njihovu solubilizaciju, povećavajući tako njihovu rastvorljivost i bioraspoloživost [BASF, 2019]. Takođe, postoji više istraživanja u oblasti elektropredenja sa Soluplus<sup>®</sup>-om kao polimerom, upravo zbog njegovih osobina i mogućnosti korišćenja sa različitim rastvaračima i lekovitim supstancama [Nagy i sar., 2012; Paaver i sar., 2014].

Soluplus<sup>®</sup> je amfifilni polimerni solubilizator, a bio je razvijen namenski za razvoj čvrstih rastvora/disperzija, tako da poveća rastvorljivost i bioraspoloživost lekovitih supstanci koje su slabo rastvorne u vodi [BASF, 2019]. Zahvaljujući njegovoj dobroj protočnosti i

odličnoj mogućnosti ekstruzije, uspešno se koristi za dobijanje čvrstih disperzija ekstruzijom topljenjem. To je nejonski, graft kopolimer, gde PEG 600 formira hidrofilnu osovinu, a polivinilkaprolaktam i polivinilacetat formiraju lipofilne bočne lance [Alam i sar., 2012]. Strukturna formula Soluplus<sup>®</sup>-a predstavljena je na slici 6.



Slika 6. Strukturna formula Soluplus<sup>®</sup>-a.

#### 1.4.4 Procena stepena mešanja lekovite supstance i polimera

U procesu farmaceutskog razvoja, često se koriste hidrofilni polimeri u obliku čvrstih disperzija lekovita supstanca-polimer, u cilju povećanja rastvorljivosti u vodi/vodenim medijumima lekovite supstance koje pripadaju II klasi Biofarmaceutskog sistema klasifikacije [Vo i sar., 2013]. Budući da se za pripremu čvrstih disperzija mogu koristiti različite pomoćne materije, kao što su polimeri, potrebno je proceniti stepen mešanja lekovite supstance sa odabranim polimerom, kao i njihovo stanje u dobijenom sistemu [Meng i sar., 2015; Greenhalgh i sar., 1999]. Ponašanje na granici faza u sistemu lek-polimer može biti ekstremno komplikovano, budući da lekovita supstanca može biti prisutna u kristalnoj formi (jedan ili više polimorfnih oblika), u delimično amorfnoj formi ili u potpuno amorfnoj formi, dok se polimeri uglavnom nalaze u amorfnom, a ređe u (semi)kristalnom stanju. Za amorfni sistem lekovita supstanca-polimer, gde su obe komponente u amorfnom stanju, fazno ponašanje zavisi od stepena mešanja lekovite

supstance i polimera [Baird and Taylor, 2012; Meng i sar., 2015]. Sam termin stepen mešanja se koristi u nauci o polimerima, kako bi se opisali polimer-polimer ili polimer-rastvarač sistemi. Ukoliko se ovaj termin primeni na lekovita supstanca-polimer smešu, sistem lekovita supstanca-polimer u kome dolazi do njihovog potpunog mešanja može biti opisan kao jedna homogena faza u kojoj su lekovita supstanca i polimer blisko izmešani na molekulskom nivou, i novonastali sistem, tj. čvrsti rastvor ima različita fizička svojstva u poređenju sa čistim komponentama [Baird and Taylor, 2012]. Postizanje mešanja u sistemu lekovita supstanca-polimer značajno je iz dva razloga. Prvo, u cilju da se postigne povećana fizička stabilnost lekovite supstance, potrebno je postići mešanje sa polimerom na molekulskom nivou. Pored toga, bitno je prepoznati da hemijski potencijal lekovite supstance može biti smanjen mešanjem sa polimerom, što utiče na promenu termodinamike i vodi do rekristalizacije. Ukoliko izostane mešanje između lekovite supstance i polimera, to negativno utiče na sposobnost polimera da inhibira kristalizaciju amorfnog leka [Marsac i sar., 2006].

Činjenica je da je stepen mešanja lekovite supstance i polimera veoma važan kako za povećanje rastvorljivosti, tako i za formiranje fizički stabilnog amorfnog sistema [Alhalaweh i sar., 2014; Greenhalgh i sar., 1999]. Postoji više kvalitativnih i kvantitativnih metoda za procenu stepena mešanja lekovite supstance i polimera određivanjem i analizom odgovarajućih termodinamičkih parametara [Meng i sar., 2015].

#### **1.4.5 Kvalitativne metode**

Ove metode su tradicionalno korišćene metode za procenu stepena mešanja polimera i lekovite supstance i baziraju se na različitim principima, kao što su određivanje parametara rastvorljivosti, upotrebu kompjuterskog *data mining*-a, merenje temperature staklastog prelaza u binarnim ili ternernm sistemima lekovita supstanca-polimer, kao i mikro-Raman tehnika za procenu homogenosti u amorfnim sistemima lekovita supstanca-polimer [Meng i sar., 2015].

##### **1.4.5.1 Parametri rastvorljivosti**

Jedan od teorijskih pristupa za procenu stepena mešanja različitih materijala, jeste metoda koja se zasniva na određivanju razlike između parametara rastvorljivosti [Hancock,

1997]. Ovaj koncept je prvi put predstavljen od strane *Hildebrand*-a i *Scott*-a, koji su pretpostavili da će materijali sličnih kohezivnih gustina energije da se mešaju (engl. *Cohesive Energy Density*, CED) [Hildebrand i Scott, 1964]. CED može biti transformisana u *Hildebrand*-ov parametar rastvorljivosti,  $\delta$  (jednačina 2) [Hancock, 1997].

$$\delta = \sqrt{\text{CED}} = \sqrt{\frac{\Delta E_v}{V_m}} \quad (2)$$

$E_v$  predstavlja energiju isparavanja, a  $V_m$  molarnu zapreminu. *Hildebrand*-ov parametar rastvorljivosti, međutim, ne daje detalje o tipu interakcija koji se javljaju među komponentama koje se mešaju [Hancock, 1997]. Za polarne komponente, kao i za komponente koje sadrže vodonične veze, ukupni parametar rastvorljivosti nije dovoljan da opiše njihovu rastvorljivosti i veliki broj autora je raščlanio/diferencirao *Hildebrand*-ov faktor,  $\delta$ , na pojedinačne komponente. Jedan od njih je *Hansen*, čija diferencijacija osnovnog parametra rastvorljivosti,  $\delta$ , podrazumeva raščlanjivanje ovog faktora na komponente koje ukazuju na različite tipove interakcija koje se mogu javiti u materijalu (disperzione sile, polarne sile i vodonične veze) [Hansen, 1967]. Ukupni parametar rastvorljivosti,  $\delta_t$  predstavlja kvadratni koren zbira parcijalnih parametara rastvorljivosti (jednačina 3):

$$\delta_t = \sqrt{\delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2} \quad (3)$$

gde je  $\delta_t$  ukupni parametar rastvorljivosti,  $\delta_d$ ,  $\delta_p$  i  $\delta_h$  predstavljaju parcijalne *Hansen*-ove parametre rastvorljivosti koji potiču od disperzionih sila, polarnih sila i vodoničnih veza, respektivno [Hansen, 1967]. Poređenjem *Hansen*-ovih parametara između dve komponente mogu biti uspostavljene jasnije veze između parcijalnih parametara rastvorljivosti i stepena mešanja [Greenhalgh i sar., 1999]. Uobičajeno se za smeše sa nižom vrednošću  $\Delta\delta_t$  predviđa viši stepen mešanja. U smešama koje imaju razliku ukupnih parametara rastvorljivosti dve komponente  $\Delta\delta_t < 7,0 \text{ Mpa}^{0,5}$ , vrlo verovatno će doći do visokog stepena mešnja dve komponente. Za one smeše u kojima je razlika  $\Delta\delta_t > 10,0 \text{ Mpa}^{0,5}$  pretpostavlja se da verovatno neće doći do mešanja komponenata [Greenhalgh i sar., 1999]. *Hansen*-ovi parametri mogu biti korišćeni u ekvivalentnoj formi *Teas* parametara. Sa ovim parametrima, svaka komponenta je predstavljena

pojedinačnom tačkom na ternernom dijagramu. Ukupni zbir *Teas* parametara je 1, ali su oni obično izraženi kao procenti [Teas, 1968].

Postoji više metoda za procenu i određivanje *Hansen*-ovih parcijalnih parametara rastvorljivosti. *Stefanis* i *Panayiotou*, su predstavili svoj model u kojem molekulska struktura svake organske komponente može biti opisana korišćenjem dve vrste funkcionalnih grupa. Funkcionalne grupe prvog reda, koje opisuju osnovnu strukturu komponente, i funkcionalne grupe drugog reda, koje su bazirane na teoriji konjugacije, gde je svaka komponenta predstavljena kao hibrid mnogih formi konjugata. Svaka forma konjugata se posmatra kao struktura sa posebnim vezama. Pravila za određivanje grupa drugog reda, i metodologija koja prati identifikaciju grupa drugog reda su date kroz više koraka [Stefanis i Panayiotou, 2012]. One zapravo daju fizičko značenje metodi i povećavaju preciznost i tačnost predviđanja [Stefanis i Panayiotou 2008; 2012]. Sledeće jednačine (4, 5 i 6) pokazuju kako se izračunava svaki od parametara rastvorljivosti:

$$\delta d = \left( \sum_i N_i C_i + \sum_j M_j D_j + 959.11 \right)^{0.4126} \text{MPa}^{1/2} \quad (4)$$

$$\delta p = \left( \sum_i N_i C_i + \sum_j M_j D_j + 7.6134 \right) \text{MPa}^{1/2} \quad (5)$$

$$\delta h = \left( \sum_i N_i C_i + \sum_j M_j D_j + 7.7003 \right) \text{MPa}^{1/2} \quad (6)$$

$C_i$  predstavlja doprinos grupe prvog reda tipa  $i$  koja se pojavljuje  $N_i$  puta u supstanci,  $i$   $D_j$  je doprinos grupe drugog reda tipa  $j$ , koja se pojavljuje  $M_j$  puta u datoj supstanci [Stefanis i Panayiotou, 2012]. Korišćeni model omogućava direktno predviđanje *Hansen*-ovih parametara rastvorljivosti organske komponente na osnovu jednostavnih linearnih jednačina, pri čemu je neophodno samo poznavati molekulsku strukturu, ali ne i eksperimentalne podatke o rastvorljivosti u različitim rastvaračima [Stefanis i Panayiotou, 2008].

#### 1.4.6 Kvantitativne metode

Za kvantitativnu procenu stepena mešanja u amorfnom sistemu lekovita supstancapolimer razvijeno je više metoda, kao što su određivanje *Flory-Huggins* interakcionog



parametra  $\chi$ , analiza difrakcije X-zraka, nuklearna magnetna rezonanca čvrstog stanja i mikroskopija atomskih sila. Svaka od navedenih metoda ima prednosti i nedostatke i korišćenjem kombinacije ovih metoda može se dobiti detaljniji uvid u stepen mešanja u amorfnom sistemu lekovita supstanca-polimer [Meng i sar., 2015].

#### 1.4.6.1 Flory-Huggins interakcioni parametar

*Flory-Huggins* interakcioni parametar je veoma poznat u farmaceutskoj industriji za određivanje interakcija lanaca polimera sa molekulima rastvarača, kao i polimer-polimer interakcija [Frezza and Ravanetti, 1994]. Marsac i saradnici su ovaj parametar upotrebili za opisivanje termodinamike mešanja sistema lekovita supstanca-ekscipijens [Marsac i sar., 2009]. Ovaj parametar može biti određen metodom smanjenja tačke topljenja. Ova metoda podrazumeva određivanje smanjenja temperature (tačke) topljenja lekovite supstance u prisustvu polimera. Izvode se DSC analize na fizičkim smešama lekovita supstanca-polimer sa različitim udelom lekovite supstance, i porede se termalne promene prilikom topljenja binarnih sistema sa topljenjem čiste lekovite supstance. Ukoliko postoji visok stepen mešanja lekovite supstance i polimera, može se uočiti značajan pad tačke topljenja na DSC termogramima, zahvaljujući egzotermnoj reakciji. U suprotnom slučaju, ukoliko je stepen mešanja nizak, smanjenje tačke topljenja je neznatno, zahvaljujući endotermnoj reakciji mešanja [Marsac i sar., 2006]. Na osnovu jednačine (7) moguće je izračunati interakcioni parametar:

$$\left( \frac{1}{T_M^{MIX}} - \frac{1}{T_M^{lek}} \right) = \frac{-R}{\Delta H_{fus}} \left[ \ln \phi_{lek} + \left( 1 - \frac{1}{m} \right) \phi_{polimer} + \chi \phi_{polimer}^2 \right] \quad (7)$$

pri čemu su  $T_M$  vrednosti temperature topljenja čiste lekovite supstance (lek) i lekovite supstance u prisustvu polimera (mix).  $\Phi_{lek}$  i  $\Phi_{polimer}$  su zapreminska frakcija leka i polimera, respektivno. Odnos zapremine polimera i zapremine leka označen je sa  $m$ .  $\Delta H_{fus}$  predstavlja energiju fuzije čiste lekovite supstance. Ova vrednost se izračunava određivanjem površine endoternog pika na DSC termogramu čiste lekovite supstance [Marsac i sar., 2006].

*Flory-Huggins* interakcioni parametar dobijen ovom metodom, koristi se za kvantitativnu procenu stepena mešanja lekovite supstance i polimera. Eksperimentalno se određuju vrednosti temperature topljenja čiste supstance i u prisustvu polimera, potom se izračunava

$\Delta H_{fus}$ , što omogućava izračunavanje  $\chi$  kao nagiba krive koja predstavlja zavisnost

$$\frac{\left(\frac{1}{T_{mix}} - \frac{1}{T_{lek}}\right) \Delta H_{fuz}}{-R} - [\ln \Phi_{lek} + \left(1 - \frac{1}{m}\right) \Phi_{polimer}] \text{ od } \phi_{polimer}^2.$$

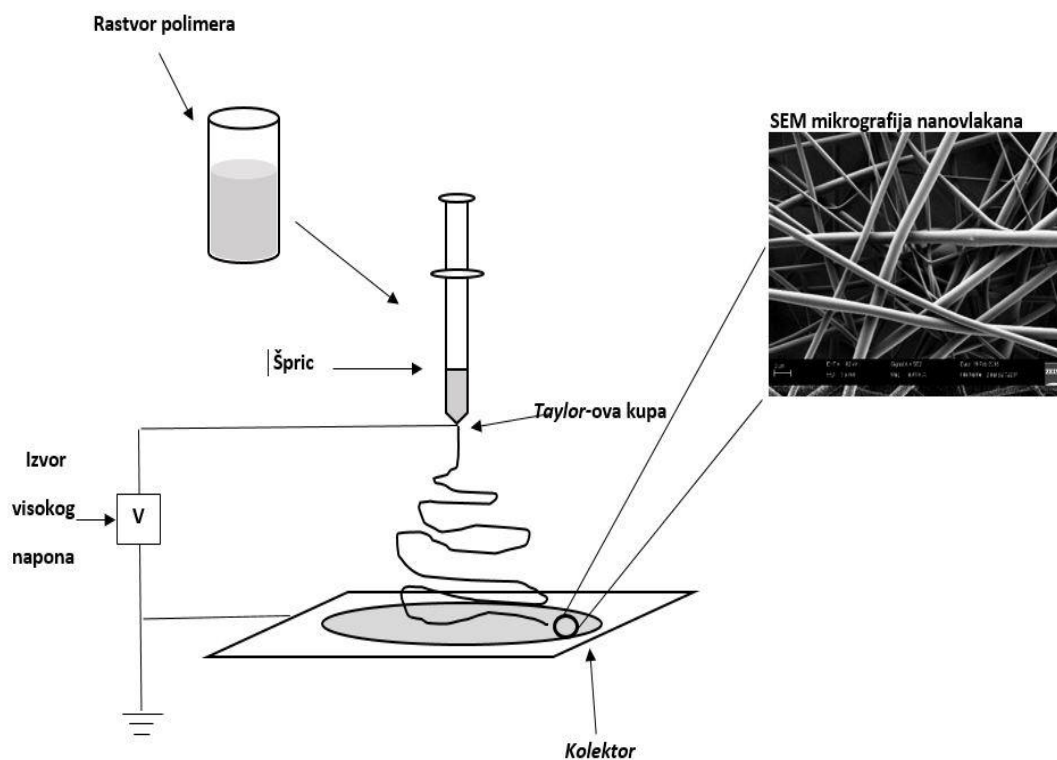
Pozitivne vrednosti interakcionog parametra ukazuju da ne postoji mešanje u sistemu lekovita supstanca-polimer, dok negativne vrednosti ukazuju da postoji visok stepen mešanja [Marsac i sar., 2006].

## 1.5 Primena tehnike elektropredenja za dobijanje nanovlakana

Nanovlakna mogu biti proizvedena korišćenjem različitih tehnika kao što su „crtanje“ (*drawing*), elektropredenje, spinning pod dejstvom sile (engl. *forcespinning*), međupovršinska polimerizacija, „izduvavanje topljenjem“ (engl. *melt blowing*), separacija faza, šablonska ekstruzija topljenjem (engl. *template melt extrusion*) i šablonska sinteza (engl. *template synthesis*) [Pelipenko i sar., 2015; Beachley i Wen, 2010].

Od 80-ih godina prošlog veka, i naročito poslednjih godina, elektropredenje je zadobilo pažnju najverovatnije zahvaljujući porastu interesa za nanotehnologiju [Yu i sar., 2009]. Ovim postupkom dobijaju se ultrafina vlakna ili vlaknaste strukture različitih polimera malih dijametara. Takođe, elektropredenje kao tehnika ima značajan uticaj na razvoj novih sistema za isporuku lekovitih supstanci kroz obezbeđenje novih strategija za njihovu proizvodnju [Yu i sar., 2009; Yu i sar., 2010; Ignatious i sar., 2010]. Šematski prikaz procesa elektropredenja polimernih nanovlakana prikazan je na slici 7.

U osnovi, postoje tri komponente: sistem za obezbeđenje visokog napona, kapilarna cev sa pipetom, ili iglom malog dijametra, i metalni okvir za sakupljanje proizvoda (kolektor) [Yu i sar., 2009]. U procesu elektropredenja, visoki napon se koristi da bi se generisao naelektrisani mlaz rastvora ili rastopa polimera izvan pipete. Pre dostizanja kolektora, rastvarač isparava i polimer očvršćava i biva sakupljen kao povezana mreža malih vlakana. Jedna elektroda je smeštena u rastvor/rastop za elektropredenje, a druga je povezana za kolektor. U većini slučajeva, kolektor je jednostavno uzemljen [Yu i sar., 2009]. Kako raste jačina električnog polja, polusferna površina fluida na vrhu kapilarne cevi se produžava tako da formira konični oblik koji se naziva *Taylor-ova kupa* [Doshi i Reneker, 1995]. Daljim pojačanjem električnog polja dostiže se kritična vrednost pri kojoj odbojna elektrostatička sila prevazilazi površinski napon i naelektrisani mlaz fluida je izbačen sa vrha *Taylor-ove kupa*. Generisani mlaz rastvora polimera se transformiše i prolazi kroz i proces elongacije koji omogućava da mlaz postane veoma tanak i dugačak. U međuvremenu, rastvarač isparava, ostavljajući formirano polimerno vlakno. U slučaju rastopa, otpušteni mlaz očvršćava kada prođe kroz struju vazduha [Doshi i Reneker, 1995; Pelipenko i sar., 2015].



Slika 7. Proces elektropredenja

### 1.5.1 Polimerna nanovlakna

Nanovlakna pogodna za biomedicinsku primenu bi trebalo da zadovoljavaju određene zahteve. Na prvom mestu bi trebalo da budu biokompatibilna, ali je poželjna i biodegradabilnost. Svakako, njihov dizajn bi trebalo da bude definisan željenim finalnim karakteristikama za specifičnu primenu [Guimaraes i sar., 2010; Rošić i sar., 2013]. Specifične osobine nanovlakana, pored njihovog malog dijametra, uključuju i veliki odnos površina-zapremina, veoma visok porozitet, malu veličinu pora, dobra mehanička svojstva i razlike u funkcionalosti površine [Pelipenko i sar., 2013a; Huang i sar., 2003]. Polimerna nanovlakna, relativno novi nanostrukturirani materijali, definisani su kao čvrsta vlakna nanometarskog dijametra i boljih mehaničkih karakteristika i fleksibilnosti nego druge forme istog materijala [Beachley i Wen, 2010; Bhardwaj i Kundu, 2010]. Mogu biti klasifikovani na osnovu njihove unutrašnje strukture na uniformna (matriks) i jezgro-omotač nanovlakna ili na osnovu njihove orijentacije kao nasumično i paralelno orijentisana nanovlakna [Pelipenko i sar., 2015]. Polimerna nanovlakna imaju dijametar od nekoliko nanometara do 1 mikrometra (obično od 50-500 nm) i imaju jedinstvene

osobine, kao što su ekstremno visoka površina po jedinici mase (na primer, nanovlakna sa dijametrom od približno 100 nm imaju specifičnu površinu od 1000 m<sup>2</sup>/g), udruženu sa visokim porozitetom, odličnim strukturno mehaničkim osobinama, visokom aksijalnom čvrstinom i prihvatljivom cenom njihovog dobijanja. Ove osobine ih čine pogodnim za formulisanje farmaceutskih oblika sa slabo rastvornim lekovitim supstancama [Yu i sar., 2009]. Drugi interesantan aspekt primene nanovlakana jeste to što je moguća laka modifikacija ne samo njihove morfologije i njihovog unutrašnjeg sadržaja već i površinske strukture tako da se može postići različita funkcionalnost. Nanovlakna lako mogu biti funkcionalizovana nakon sinteze (na primer hemijskom ili fizičkom depozicijom pare) čime se izboljšavaju njihove karakteristike [Yu i sar., 2009; Ignatious i sar., 2010; Paaver i sar., 2014].

Materijali u formi nanovlakana poseduju jedinstvene osobine, zahvaljujući njihovim nanometarskim dimenzijama. Već je pomenuto da, teorijski, nanovlakna mogu biti proizvedena korišćenjem različitih polimera. Međutim, pri razvoju formulacije nanovlakana, karakteristike polimera (molekulska masa, rastvorljivost, stepen polimerizacije, kompatibilnost sa lekovitim supstancom) moraju biti detaljno razmotrene, budući da one daju različite mehaničke karakteristike vlakana, brzinu degradacije i interakcije sa ćelijama u tretmanu rana (engl. wound dressing) [Beachley i Wen, 2010; Wang i sar., 2009]. Najčešće korišćeni polimeri koji se koriste za dobijanje polimernih nanovlakana elektropredenjem su hitozan [Beachley i Wen, 2010; Janković i sar., 2013; Bhattarai i sar., 2005], kolagen, elastin, hijaluronska kiselina [Beachley i Wen, 2010], alginat, celuloza [Rošić i sar., 2012], polivinil alkohol i polietilen oksid [Rošić i sar., 2012; Pelipenko i sar., 2015; Janković i sar., 2013]. Kada je odabran polimer sa željenim karakteristikama, sledeći korak je priprema disperzije polimera, gde se javljaju drugi faktori za razmatranje sa aspekta elektropredenja, kao što su koncentracija polimera, površinski napon i provodljivost disperzije, viskozitet disperzije, koja zavisi od koncentracije polimera ali i osobine rastvarača [Pelipenko i sar., 2015]. Zahvaljujući biokompatibilnosti i bezbednosti, voda je najpoželjniji rastvarač, ali je njena upotreba ograničena na hidrofilne polimere. Najčešće korišćeni organski rastvarači za elektropredenje su aceton, dihlormetan, metanol, etanol, sirćetna kiselina, dimetilformamid, etil acetat, trifluoroetanol, tetrahidrofuran i mravlja kiselina [Bhardwaj i Kundu, 2010]. Ključni nedostatak organskih rastvarača jeste njihova toksičnost, cena i

često velika isparljivost [Li i sar., 2006]. Disperzija polimera koja se koristi za elektropredenje najčešće je kombinovana sa drugim ekscipijensima kako bi se poboljšao proizvodni proces i/ili funkcionalnost nanovlakana u pogledu biokompatibilnosti i/ili terapijske efikasnosti. Da bi se postigla mogućnost elektropredenja prirodnih ili polusintetskih polimera, poboljšala reproduktivnost procesa proizvodnje ili promenila morfologija proizvoda od nehomogenih do homogenih, ustaljena je praksa da se dodaju surfaktanti ili soli u rastvor polimera. Mogu biti korišćene različite soli i surfaktanti u ove svrhe. Tako su Tween 80 i natrijum-hlorid korišćeni za elektropredenje rastvora hidroksietilceluloze [Rošić i sar., 2011]. Wang i saradnici su koristili natrijum-hlorid i kalcijum-karbonat za dobijanje polikaprolaktonskih vlakana [Wang i sar., 2009]. Arayanarakul i saradnici su procenjivali uticaj različitog tipa neorganskih soli (natrijum-, litijum-, kalijum, magnezijum- i kalcijum-hlorid) ili natrijum laurilsulfata, na formiranje proširenja i/ili morfologiju elektropredenih polietilenoksidnih vlakana [Arayanarakul i sar., 2006]. Ding i saradnici su, pored natrijum-hlorida, ispitali uticaj i gvožđe(III)-nitrita na dijametar elektropredenih vlakana polivinil alkohola [Ding i sar., 2010].

### **1.5.2 Karakterizacija polimernih nanovlakana**

Karakterizacija nanovlakana dobijenih elektropredenjem ostaje jedan od najtežih zadataka, budući da se retko mogu dobiti pojedinačna vlakna. Kako bi se što bolje razumeo proces elektropredenja, postavka celog procesa, počev od odabira polimera do mehaničkog testiranja dobijenih nanovlakana mora da bude vrlo pažljivo precizirana.

Fizička karakterizacija je povezana sa strukturom i morfologijom uzorka, i praktično unutrašnja struktura nanovlakana određuje njihove fizičke i mehaničke karakteristike. Geometrijske karakteristike nanovlakana podrazumevaju dijametar vlakana, raspodelu dijametara, orijentaciju vlakana, i morfologiju vlakana (oblik na poprečnom preseku i hrapavost površine). Za karakterizaciju geometrijskih osobina, koriste se različite tehnike, kao što su: skenirajuća elektronska mikroskopija (engl. *Scanning Electron Microscopy – SEM*), transmisiona elektronska mikroskopija (engl. *Transmission Electron Microscopy – TEM*) i mikroskopija atomskih sila (engl. *Atomic force microscopy – AFM*) [Ramakrishna, 2005; Bhardwaj i Kundu, 2010].

Strukturalna karakterizacija nanovlakana može biti urađena infracrvenom spektroskopijom sa Furijeovom transformacijom (engl. *Fourier-transform infrared spectroscopy – FTIR*), kao i nuklearnom magnetnom rezonancom (engl. *Nuclear magnetic resonance – NMR*). Ukoliko se pomešaju dva polimera za dobijanje nanovlakana, ne samo da struktura ova dva materijala može biti detektovana, već i njihove intermolekularne interakcije mogu biti određene korišćenjem ovih metoda. Kristalna struktura elektroprednih nanovlakana može biti ispitana korišćenjem difrakcije X zraka (engl. *X-ray diffraction – XRD*), diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (engl. *Differential scanning calorimetry – DSC*) i transmisione elektronske mikroskopije. Površinske hemijske karakteristike mogu biti procenjene ispitivanjem hidrofilitnosti, koja može biti merena analizom kontaktnog ugla vode na površini membrane nanovlakna [Ramakrishna, 2005; Bhardwaj i Kundu, 2010]. Karakterizacija nanovlakana impregniranih lekovitom supstancom, pored već pomenutih metoda, podrazumeva i određivanje sadržaja lekovite supstance u vlaknima, kao i brzinu rastvaranja lekovite supstance iz vlakana.

Precizna merenja mehaničkih karakteristika nanovlakana su ključna, naročito za biomedicinsku primenu, jer u ovom slučaju mrežana novlakana mora izdržati sile koje se javljaju tokom rasta tkiva ili tokom normalnih fizioloških aktivnosti, kao što je pulsni protok krvi. Tokom ove karakterizacije potrebno je pažljivo rukovati uzorcima nanovlakana kako bi se izbeglo njihovo oštećenje. Različiti pristupi su korišćeni u svrhu mehaničke karakterizacije nanovlakana korišćenjem nanoindentacije, testova zatezanja gde se određuje mehanička snaga vlakana itd [Bhardwaj i Kundu, 2010]. U tabeli 2 sumirane su najčešće korišćene metode za karakterizaciju nanovlakana.

Tabela 2. Metode koje se najčešće koriste za karakterizaciju nanovlakana

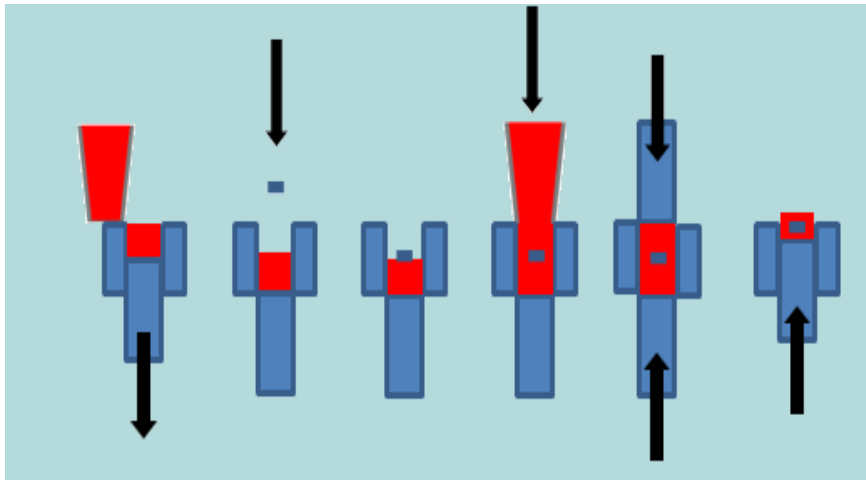
<b>Metoda</b>	<b>Primena metoda i specifičnosti</b>
SEM	Ispitivanje morfologije nanovlakana; može biti potrebno prethodno oblaganje uzoraka platinom ili zlatom koje utiče na određivanje dijametra [Klang i sar., 2013].
TEM	Ispitivanje morfologije nanovlakana (alternativa SEM); ispitivanje unutrašnje strukture nanovlakana za šta je potrebna razlika u elektronskoj gustini među strukturama [Klang i sar., 2013].
AFM	Morfološka karakterizacija pojedinačnih nanovlakana; ispitivanje brzine bubrenja nanovlakana u vodenim medijumima; mehanička karakterizacija (određivanje Jangovog modula) na pojedinačnim nanovlaknima; određivanje sastava vlakna korišćenjem tehnike faznih slika [Janković i sar., 2013; Pelipenko i sar., 2013b].
FE-SEM	Morfološka karakterizacija objekata veličina do 1,5 nm; nema potrebe za primenom provodljivog sloja [Klang i sar., 2013].
Difrakcija X zraka	Određivanje kristaliniteta i hemijska karakterizacija [Bhardwaj i Kundu, 2010].
DSC	Određivanje kristaliniteta [Frone i sar., 2013].
NMR	Karakterizacija molekulske strukture; karakterizacija intermolekulskih interakcija (za nanovlakna sa dve ili više komponenata) [Zhang i sar., 2011].
Merenje kontaktnog ugla	Analiza hidrofilnosti/hidrofobnosti površine nanovlakana [Pelipenko i sar., 2013b].
Test zatezanja	Određivanje orijentacije nanovlakana u mreži nanovlakana. Mehaničke karakteristike mreže nanovlakana (npr. mehanička snaga) [Lee and Deng, 2012].



## 1.6 Oblaganje kompresijom

Oblaganje je značajna farmaceutsko-tehnoloških operacija u proizvodnji čvrstih farmaceutskih oblika. Jedna od tehnika za oblaganje jeste oblagane kompresijom [Lin i Kawashima, 2012]. Ova tehnika je poznata i kao “suvo” oblaganje, tj. oblaganje bez korišćenja rastvarača [Lin i Kawashima, 2012; Ozeki i sar., 2004; Bose i sar., 2010]. Ovo je stara tehnika i sredinom XX veka predstavljena je njena primena prilikom razvoja preparata sa inkompatibilnim lekovitim supstancama [Lin i Kawashima, 2012]. U poslednje dve decenije sve više se koristi ova tehnika, upravo zbog toga što ne zahteva upotrebu rastvarača, relativno je kratkotrajan proces, i može se postići oblaganje jezgara veće mase nego kod tehnika za oblaganje uz korišćenje rastvarača. Za dobijanje ovih tableta potrebna je relativno jednostavna oprema - tablet mašina sa mogućnošću oblaganja komprimovanjem [Ozeki i sar., 2004].

Prednosti ovog načina oblaganja tableta su već pomenute, jednostavna je formulacija obloge kao i razvoj proizvodnog postupka, opreme i materijali su dostupni, a postoji i fleksibilnost u pogledu dobijanja željenog profila oslobađanja. Takođe, prednost predstavlja i mogućnost korišćenja ove tehnike za formulisanje farmaceutskih preparata sa lekovitim supstancama koje su osetljive na vlagu, svetlost, kiseonik, kiselu sredinu, tj. njihova zaštita od ovih faktora. Na kraju, moguća je izolacija jedne od druge inkompatibilne lekovite supstance i njihova inkorporacija u jedan farmaceutski oblik [Lin i Kawashima, 2012]. Oblaganje kompresijom je sve više zastupljeno u razvoju hronofarmaceutskih sistema, pri čemu se variranjem sastava i debljine omotača mogu dobiti raznovrsni profili oslobađanja lekovite supstance [Ambedkar Sunil i sar., 2013]. Još jedna od prednosti ove tehnike je u tome što se mogu koristiti ekscipijensi koji se koriste za konvencionalne farmaceutske preparate. Konvencionalni postupak proizvodnje tableta obloženih kompresijom podrazumeva nekoliko faza (slika 8). Faze oblaganja kompresijom podrazumevaju: punjenje matrice polovinom mase omotača, centriranje prethodno komprimovanog jezgra, dodavanje ostatka smeše za omotač, komprimovanje i izbacivanje gotove tablete [Lin i Kawashima, 2012; Ozeki i sar., 2004].



Slika 8. Prikaz faza u procesu oblaganja kompresijom

Ipak, za formulaciju ovih tableta postavljeni su određeni zahtevi. Jedan od najvažnijih zahteva, koji ujedno predstavlja i najčešći problem, jeste centriranje jezgra za oblaganje, kako bi omotač svugde bio jednake debljine [Lin i Kawashima., 2012]. Problem decentralizovanog jezgra moguće je prevazići primenom metode za jednostepeni proces proizvodnje tableta obloženih kompresijom (engl. *One-step drug-coated tablets – OSDRC*). Ova metoda ne zahteva prethodnu pripremu tabletnih jezgara, već se tablete obložene kompresijom dobijaju u jednom koraku, zahvaljujući posebnom dizajnu tabletnih alata. Svaki alat (gornji i donji) ima dvostruku strukturu, spoljašnji i centralni alat, što omogućava jednostavan proces dobijanja obloženih tableta, bez problema centriranja jezgra ili neujednačene debljine omotača [Ozeki i sar., 2004].

## 2.0 Cilj istraživanja

**Cilj istraživanja je unapređenje farmaceutskog razvoja tableta sa pulsним oslobađanjem karvedilola tehnikama elektrospredjenja i oblaganja kompresijom**

Istraživanje se sastoji iz četiri dela koja imaju za cilj:

- 1) Procena stepena mešanja model supstance, karvedilola i polimera Soluplus<sup>®</sup>-a određivanjem termodinamičkih parametara. Korišćene su kvalitativna metoda zasnovana na određivanju *Hansen*-ovih parametara rastvorljivosti, odnosno razlike ukupnog parametra rastvorljivosti leka i polimera i kvantitativna metoda za određivanje stepena mešanja karvedilola i Soluplus<sup>®</sup>-a određivanjem *Flory-Huggins* interakcionog parametra.
- 2) Izrada nanovlakana sa karvedilolom i Soluplus<sup>®</sup> polimerom primenom tehnike elektrospredjenja i ispitivanje efikasnosti inkorporiranja karvedilola u nanovlakna sa Soluplus<sup>®</sup>-om uz praćenje kritičnih atributa kvaliteta dobijenih vlakana, brzine rastvaranja karvedilola, morfologije vlakana. Formiranje regiona rastvorljivosti-spinabilnosti za Soluplus<sup>®</sup> na ternernom grafiku. Optimizacija procesa dobijanja nanovlakana tehnikom elektrospredjenja i karakterizacija dobijenih vlakana.
- 3) Razvoj formulacija tableta sa trenutnim oslobađanjem karvedilola. Ispitivana je brzina rastvaranja karvedilola iz tableta dobijenih direktnom kompresijom smeše praškova ili direktnom kompresijom nanovlakana. Procenjivan je uticaj superdezintegratora (natrijum-skrobglikolat, krosповidon), sredstva za dpunjavanje (Ludipress<sup>®</sup>), osmotski aktivnih supstanci (natrijum-hlorid, manitol) na brzinu rastvaranja karvedilola.
- 4) Ispitivanje uticaja formulacionih i procesnih parametara na oblaganje kompresijom i kritične attribute kvaliteta tableta obloženih kompresijom, brzina rastvaranja karvedilola iz obloženih tableta i vreme odlaganja oslobađanja (*lag time*). Procena i kategorizacija stepena rizika atributa materijala i procesnih parametara po kritične attribute kvaliteta obloženih tableta korišćenjem FMEA.

## 3.0 Eksperimentalni deo

### 3.1 Materijali

U eksperimentalnom radu kao aktivna supstanca korišćen je karvedilol (Hemofarm, Beograd, Srbija). Kao pomoćne supstance korišćeni su: kopolimer polietilen glikol kaprolaktam-polivinil acetat (Soluplus<sup>®</sup>, BASF, Nemačka), rastvarači (sirćetna kiselina, aceton, acetonitril, 1-butanol, 2-propanol, metilizobutil keton, etil acetat, hlorovodonična kiselina) (Sigma-Aldrichm, Poole, Velika Britanija), polietilen oksid (Polyox<sup>®</sup> WSR Coagulant, Polyox<sup>®</sup> WSR 301 i Polyox<sup>®</sup> WSR N60K) (Dow Chemical Company, Charleston, USA), Ludipress<sup>®</sup> (laktoza monohidrat, povidon, krosopovidon) (BASF; Nemačka), natrijum-hlorid (Sigma-Aldrichm, Steinheim, Nemačka); laktoza, monohidrat (Sigma-Aldrichm, Steinheim, Nemačka), manitol (PEARLITOL<sup>®</sup> 200SD, Roquette Pharma, Lestrem, Francuska). Sve ostale upotrebljene hemikalije i reagensi bili su farmakopejskog kvaliteta [Ph.Eur. 9.0].

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Procena stepena mešanja

Jedan od potencijalnih načina modifikacije slabe rastvorljivosti u vodi, tj. brzine rastvaranja karvedilola jeste formiranje čvrstih amorfnih disperzija. Da bi se postigla visoka fizička stabilnost lekovite supstance u čvrstim disperzijama, potrebno je postići mešanje komponenata na molekulskom nivou [Marsac i sar., 2006]. U ovom slučaju, bilo je potrebno proceniti kakav je stepen mešanja karvedilola i Soluplus<sup>®</sup> polimera.

#### 3.2.1.1 Kvalitativna metoda

Najpre je korišćena kvalitativna metoda koja podrazumeva određivanje razlike ukupnog parametra rastvorljivosti komponenata ( $\Delta\delta_i$ ), tj. karvedilola i Soluplus<sup>®</sup>-a. Ukupni parametar rastvorljivosti određen je kao doprinos interakcija koje potiču od disperzionih sila, polarnih interakcija i vodoničnih veza funkcionalnih grupa [Hansen, 2007]. Parametri rastvorljivosti Soluplus<sup>®</sup>-a preuzeti su iz literature [Đuriš i sar., 2013]. Parametri rastvorljivosti karvedilola izračunati su metodom doprinosa grupa predloženom od strane *Stefanis* i *Panayiotou*-a [Stefanis i Panayiotou, 2008; 2012].

Prema *Stefanis-Panayiotou* metodi, molekulska struktura svake organske supstance može biti predstavljena korišćenjem dva tipa funkcionalnih grupa: grupe prvog reda (npr. CH<sub>3</sub>–, –CH<sub>2</sub>–, C≡C) i grupe drugog reda (npr. (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>–CH–, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>–C–, CH<sub>3</sub>(CO)CH<sub>2</sub>–) [Stefanis i Panayiotou, 2012]. Stoga je potrebno samo poznavati molekulsku strukturu supstanci. Za izračunavanje *Hansen*-ovih parametara rastvorljivosti za karvedilol, korišćene su jednačine 4-6, dok su potrebni podaci za njihovo izračunavanje preuzeti iz literature (tabela 3 i 4) [Stefanis i Panayiotou, 2008; 2012].

Tabela 3. Grupe prvog reda i njihovi parcijalni parametri rastvorljivosti ( $\delta_d$ ,  $\delta_p$ ,  $\delta_h$ )

Grupe prvog reda	$\delta_d$	$\delta_p$	$\delta_h$	Grupe prvog reda	$\delta_d$	$\delta_p$	$\delta_h$
-CH <sub>3</sub>	-123,01	-1,6444	-0,7458	CONH <sub>2</sub>	-1,22	5,9361	5,3646
-CH <sub>2</sub> -	1,82	-0,3141	-0,3877	CON(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	95,97	5,5309	3,2455
-CH<	82,94	0,6051	-0,2064	CH <sub>2</sub> SH	214,84	-0,9940	4,5321
>C<	182,13	2,0249	-0,0113	CH <sub>3</sub> S	***	0,2451	-1,2669
CH <sub>2</sub> =CH-	-126,15	-2,0170	-1,1783	CH <sub>2</sub> S	168,57	0,5730	-0,0838
-CH=CH-	28,65	-0,5037	-0,1253	I	197,67	0,1060	0,3321
CH <sub>2</sub> =C<	-31,62	-0,9052	-0,7191	Br	109,79	0,5207	-0,9087
-CH=C<	62,48	-1,1018	-1,7171	CH <sub>2</sub> Cl	47,17	0,5013	-0,4498
>C=C<	50,10	0,9957	-1,9773	CHCl	73,01	2,6796	-1,3563
CH <sub>2</sub> =C=CH-	-161,71	***	-0,7545	CCl	385,39	1,8196	0,1473
CH≡C-	45,86	-1,5147	1,2582	CHCl <sub>2</sub>	197,67	1,6255	-3,0669
C≡C	9,56	-0,9552	-1,0176	CCl <sub>2</sub>	72,60	0,1035	-1,3220
ACH	29,87	-0,5771	-0,3554	CCl <sub>3</sub>	***	1,1060	-2,5679
AC	98,84	0,7661	-0,1553	ACCl	141,54	-0,0941	-0,7512
ACCH <sub>3</sub>	27,67	-0,6212	-1,1409	ACF	27,74	0,1293	-0,6613
ACCH <sub>2</sub> -	89,07	0,8019	-0,2298	Cl-(C C)	45,32	2,2673	-0,5258
CH <sub>3</sub> CO	-29,41	2,1567	-1,1683	CF <sub>3</sub>	-13,79	-2,1381	-1,2997
CH <sub>2</sub> CO	114,74	3,6103	-0,3929	CH <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	***	6,6451	-1,0669
CHO (aldehidi)	-31,35	3,3159	0,2062	CHNO <sub>2</sub>	***	7,7753	-2,1087
COOH	-38,16	0,7153	3,8422	ACNO <sub>2</sub>	219,22	4,4640	-0,7302
CH <sub>3</sub> COO	-53,86	-0,6075	1,7051	CH <sub>2</sub> CN	-29,09	6,3586	-0,7297
CH <sub>2</sub> COO	89,11	3,4942	1,3893	CF	20,32	***	***
HCOO	***	1,7056	2,3049	F (osim gore navedenog)	-80,11	***	***
COO	27,57	3,3401	1,1999	CH <sub>2</sub> =C=C<	6,64	***	-1,7087
OH	-29,97	1,0587	7,3609	O (osim gore navedenog)	18,09	3,5248	0,0883
ACOH	58,52	1,0520	6,9757	Cl (osim gore navedenog)	76,35	1,7491	-0,2917
CH <sub>3</sub> O	-68,07	0,0089	0,2676	>C=N-	-10,55	-0,1692	-5,3820
CH <sub>2</sub> O	13,40	0,8132	-0,1196	-CH=N-	186,40	2,7015	0,5507
CHO (etri)	111,46	1,6001	0,4873	NH (osim gore navedenog)	***	-0,0746	2,0646
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	15,51	3,3880	8,5893	CN (osim gore navedenog)	49,36	6,3705	-0,5239
CH <sub>2</sub> O (ciklični)	49,32	0,1227	0,1763	O=C=N-	15,22	1,4695	4,1129
CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	-49,96	-0,3449	2,7280	SH (osim gore navedenog)	190,87	1,8229	4,9279
CHNH <sub>2</sub>	18,53	-1,4337	0,5647	S (osim gore navedenog)	201,91	8,5982	-0,4013
CH <sub>3</sub> NH	***	0,5060	5,7321	SO <sub>2</sub>	182,83	11,0254	-0,3602
CH <sub>2</sub> NH	96,18	0,2616	1,4053	>C=S	-0,46	0,5216	3,0519
CH <sub>3</sub> N	170,59	1,0575	1,8500	>C=O (osim gore navedenog)	-127,16	0,7691	1,7033
CH <sub>2</sub> N	152,54	2,6766	1,5557	N (osim gore navedenog)	267,06	2,2212	1,3655
ACNH <sub>2</sub>	253,66	1,6493	4,4945	*** nije dostupan podatak			

Tabela 4. Grupe drugog reda i njihovi parcijalni parametri rastvorljivosti ( $\delta_d$ ,  $\delta_p$ ,  $\delta_h$ )

Grupe drugog reda	$\delta_d$	$\delta_p$	$\delta_h$
$(\text{CH}_3)_2\text{-CH-}$	7,63	0,0365	0,3019
$(\text{CH}_3)_3\text{-C-}$	-0,03	1,1593	-0,1924
Prsten od 5 ugljenikovih atoma	-81,93	-2,3673	0,2586
Prsten od 6 ugljenikovih atoma	-26,15	-3,6661	***
$-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}-$	-5,69	-3,3100	-1,2207
$\text{CH}_3\text{-C}=\text{C}$	-4,45	0,3461	0,4418
$-\text{CH}_2\text{-C}=\text{C}$	-29,67	-2,3189	0,5613
$>\text{C}/\text{H}$ ili $\text{C}/-\text{C}=\text{C}$	-5,38	***	-1,0241
Veza u prstenu	-54,05	***	***
$\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_2\text{-}$	3,57	-0,4108	-0,3628
$\text{C}_{\text{prsten}}=\text{O}$	-46,57	0,1972	-0,4496
ACCOOH	-37,57	-0,6284	-0,8552
$>\text{C}/\text{H}$ ili $\text{C}/-\text{COOH}$	***	-0,2450	1,2554
$\text{CH}_3(\text{CO})\text{OC}/\text{H}$ ili $\text{C}/<$	-40,56	-0,0652	0,3864
$(\text{CO})\text{C}/\text{H}_2/\text{COO}$	***	-2,3624	0,8545
$(\text{CO})\text{O}(\text{CO})$	-92,46	-0,9818	1,5759
ACHO	46,84	-1,8120	-0,9192
$>\text{CHOH}$	16,54	0,2366	-0,2453
$>\text{C} < \text{OH}$	-5,97	-0,0069	1,3813
$-\text{C}(\text{OH})\text{C}(\text{OH})-$	***	0,6669	0,2493
$-\text{C}(\text{OH})\text{C}(\text{N})$	-7,03	0,8750	-0,7322
$\text{C}_{\text{prsten}}-\text{OH}$	-6,40	-3,6065	0,5836
$\text{C}-\text{O}-\text{C}=\text{C}$	25,23	0,5480	1,1279
AC-O-C	35,82	0,7781	0,6689
$>\text{N}/\text{H}$ ili $\text{C}/$ (u prstenu)	53,29	-1,6876	-0,0132
$-\text{S}$ (u prstenu)	91,57	0,2513	0,2663
ACBr	33,35	-0,4478	0,3149
$(\text{C}=\text{C})-\text{Br}$	-85,85	0,0686	-1,1154
Prsten od 3 ugljenikova atoma	15,35	1,7962	-0,7224
ACCOO	-38,39	0,3670	-0,2340
$\text{AC}(\text{ACH}_m)_2\text{AC}(\text{ACH}_n)_2$	-33,14	-1,4784	0,7468
$\text{O}_{\text{prsten}}-\text{C}_{\text{prsten}}=\text{O}$	13,89	2,7261	0,2185
AC-O-AC	-136,10	-3,4995	1,8763
$\text{C}_{\text{prsten}}\text{H}_m = \text{N}_{\text{prsten}}-\text{C}_{\text{prsten}}\text{H}_n = \text{C}_{\text{prsten}}\text{H}_p$	53,11	-0,5075	-2,1004
$\text{N}_{\text{prsten}}\text{H}_m - \text{C}_{\text{prsten}}=\text{O}$	93,54	2,0813	1,2226
$-\text{O}-\text{CH}_m - \text{O}-\text{CH}_n-$	31,52	0,3293	0,2527
$\text{C}(=\text{O})-\text{C}-\text{C}(=\text{O})$	-61,38	-0,4126	1,2240
*** nije dostupan podatak			

Ukupan parametar rastvorljivosti karvedilola je izračunat korišćenjem jednačine 3. Procena stepena mešanja karvedilola i Soluplus<sup>®</sup>-a utvrđena je izračunavanjem razlike ukupnih parametara rastvorljivosti ove dve komponente.

Ova metoda nije precizna i samo grubo upućuje na mogućnost procesa mešanja komponentata u sistemu. Zato je za detaljnije ispitivanje i procenu stepena mešanja potrebno koristiti neku od kvantitativnih metoda [Meng i sar., 2015].

### 3.2.1.2 Kvantitativna metoda – *Flory-Huggins* interakcioni parametar

Za primenu ove metode i izračunavanje *Flory-Huggins* interakcionog parametra, korišćena je metoda smanjenja tačke topljenja.

Najpre su pripremljene fizičke smeše karvedilola i Soluplus<sup>®</sup>-a. Smeše su pripremljene odmeravanjem i mešanjem odgovarajućih količina supstanci (karvedilola i Soluplus<sup>®</sup>-a). Pripremljeno je po 10g svake smeše, koje su imale različit maseni udeo karvedilola (prikazano u tabeli 5).

Tabela 5. Fizičke smeše F1-F8 i F1p-F3p

Fizičke smeše	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F1p	F2p	F3p
% karvedilola (m/m)	5	10	20	30	40	50	65	80	12,5	15	17,5

Pripremljene fizičke smeše karvedilola i Soluplus<sup>®</sup>-a, kao i čista lekovita supstanca karvedilol i polimer Soluplus<sup>®</sup>, podvrgnuti su termalnoj analizi primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije. DSC analiza je izvršena na DSC 1 STAR<sup>e</sup> system (Mettler Toledo GmbH Analytical, Giessen, Nemačka), u struji čistog azota protoka 50 ml/min, i uz brzinu zagrevanja 25 °C do 200 °C po 10 °C/min. Svaki uzorak je precizno izmeren (6-10 mg) u aluminijumskoj posudi. Kalibracija temperaturnih senzora je izvršena korišćenjem standarda indijuma.

Nakon sprovedene termalne analize, izvršena je detaljna analiza dobijenih termograma. topljenja fizičkih smeša ekstrapolacijom je uzet za početak topljenja ukupne (*bulk*) endoterme. *Flory-Huggins* interakcioni parametar,  $\chi$ , je potom izračunat korišćenjem linerane regresione analize jednačine 7. Potom je interakcioni parametar izračunat kao nagib krive predstavljene datom funkcijom. Na osnovu dobijene vrednosti interakcionog parametra, procenjen je stepen mešanja karvedilola i Soluplus<sup>®</sup>-a.



### 3.2.2 Elektropredenje

#### 3.2.2.1 Mapiranje oblasti rastvorljivosti Soluplus<sup>®</sup>-a na *Teas* grafiku

Koncentracija Soluplus<sup>®</sup>-a koja je korišćena u procesu elektropredenja je 20% (m/m). Ova koncentracija je izabrana nakon preliminarnih testiranja gde su različite koncentracije (30% (m/m), 20% (m/m), 10% (m/m)), polimera bile rastvorene u izabranim rastvaračima i nakon pregleda literature [Paaver i sar., 2014; Nagy i sar., 2012].

Tabela 6. Rastvarači korišćeni za mapiranje oblasti rastvorljivosti Soluplus<sup>®</sup>-a i njihovi frakcioni parametri rastvorljivosti [Barton, 1983]

Rastvarači	$f_d$	$f_p$	$f_h$
Aceton	47	32	21
Acetonitril	39	45	16
1-Butanol	43	15	42
Hloroform	67	12	21
Aceton:Hloroform (90:10 m/m)	49	30	21
Aceton:Hloroform (70:30 m/m)	53	26	21
Etanol	36	18	46
Metanol	30	22	48
2-Propanol	41	16	43
1-Propanol	40	16	44
Sirćetna kiselina	40	22	38
Mravlja kiselina	33	28	39
Etilen glikol	30	18	52
Glicerol	25	23	52
Voda	18	28	54

Rastvarači su procenjivani na osnovu vrednosti frakcionih parametara rastvorljivosti, koji su dobijeni iz literature ili izračunati za smeše rastvarača [Barton, 1983; Burke, 1984]. Ovi frakcioni parametri rastvorljivosti,  $f_d$ ,  $f_p$  i  $f_h$ , izvedeni su iz *Hansen*-ovih parcijalnih parametara rastvorljivosti,  $\delta_d$ ,  $\delta_p$  i  $\delta_h$ , respektivno (jednačine 8,9,10). Pri čemu je zbir ova tri frakciona parametara uvek jednak broju 100.

$$f_d = \frac{\delta d}{\delta d + \delta p + \delta h} \quad (8)$$

$$f_p = \frac{\delta p}{\delta d + \delta p + \delta h} \quad (9)$$

$$f_h = \frac{\delta h}{\delta d + \delta p + \delta h} \quad (10)$$

Trougaoni grafik predstavlja frakcione parametre kao ternerni dijagram. Svaka strana trougla predstavlja određenu promenljivu ( $f_d$ ,  $f_p$  i  $f_h$ ) i ima skalu od 0 do 100 [Barton, 1983]. Rastvorljivost 20% (m/m) Soluplus<sup>®</sup>-a ispitivana je u 15 različitih rastvarača (tabela 6). Sistemi su mešani magnetnom mešalicom. Stepen bubrenja ili rastvorljivosti polimera u rastvaraču/smeši rastvarača je vizuelno procenjen nakon 10 minuta, 1h i 24h mešanja. Posmatrana rastvorljivost kategorisana je i predstavljena kao „delimična“ (belo obojeni, zamućen rastvor i talog) ili „visoka“ (bezbojan rastvor). Oblast rastvorljivosti Soluplus<sup>®</sup>-a konstruisana je crtanjem konturne oblasti na ternernom dijagramu oko tačaka koje predstavljaju rastvarače kod kojih je nakon 24h od mešanja, rastvorljivost Soluplus<sup>®</sup>-a kategorisana kao “visoka”.

### 3.2.2.2 Izbor rastvarača za proces elektropredenja

U ovoj fazi izbora optimalnog rastvarača za elektropredenje karvedilola i Soluplus<sup>®</sup>-a, razmatrane su dielektrične konstante rastvarača i mogućnost rastvarača da rastvori karvedilol (na osnovu podataka iz literature ili dobijenih eksperimentalno), kao i na osnovu rezultata dobijenih na prikazanom ternernom dijagramu. Razmatranjem navedenih karakteristika izvršen je izbor odgovarajućih rastvarača. Nakon toga, sproveden je niz proba procesa elektropredenja, gde su varirani procesni parametri (napon i protok rastvora) do postizanja stabilnosti *Taylor*-ove kupe, u cilju procene same “spinabilnosti” rastvora Soluplus<sup>®</sup>-a u izabranim rastvaračima. U toku procesa elektropredenja praćena je stabilnost *Taylor*-ove kupe, koja je bila kritični faktor za određivanje pogodnosti rastvarača. Stabilnost *Taylor*-ove kupe i ponašanje mlaza po izlasku iz kapilare (prekidanje mlaza, začepljenje kapilare rastvorom, pravljenje naslaga na vrhu kapilare i njihovo otkidanje, pojava kapljica umesto mlaza) pažljivo su posmatrani i procenjivani za svaki rastvor. Takođe, proizvodi dobijeni u ovoj fazi,

posmatrani su pod optičkim mikroskopom, u cilju uočavanja čestica, vlakana, proširenja/čvorića na vlaknima.

### 3.2.2.3 Priprema karvedilol-Soluplus<sup>®</sup> rastvora

Kao rastvarač za Soluplus<sup>®</sup> odabrana je smeša rastvarača acetona i hloroforma 9:1 (m/m). Pripremljeno je 50 g rastvora, gde je 20% (m/m) rastvor Soluplus<sup>®</sup>-a rastvoreno u smeši rastvarača. Rastvor je tokom 2 h mešan na magnetnoj mešalici, na sobnoj temperaturi. Nakon 2 h, od pripremljenog rastvora Soluplus<sup>®</sup>-a, pripremljeni su rastvori sa različitim koncentracijama karvedilola. Dodata je odgovarajuća količina karvedilola tako da se dobiju 5%, 10%, 20%, 30%, 40% i 50% (m/m) rastvori u 20% (m/m) Soluplus<sup>®</sup>-a, računato na suhu masu vlakna (tabela 7). Ovi rastvori su mešani na magnetnoj mešalici dodatnih sat vremena pre procesa elektropredenja.

Tabela 7. Formulacije nanovlakana

<b>Formulacije</b>	<b>N1</b>	<b>N2</b>	<b>N3</b>	<b>N4</b>	<b>N5</b>	<b>N6</b>
<b>Karvedilol (g)</b>	0,53	1,11	2,50	4,29	6,67	10,00
<b>Soluplus<sup>®</sup> (g)</b>	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00

### 3.2.2.4 Proces elektropredenja

Elektropredenje karvedilol-Soluplus<sup>®</sup> rastvora izvedeno je korišćenjem elektrospinaera (Fluidnatek LE-100; Bioinici, Valensija, Španija), uz odgovarajuće procesne parametre u odnosu na rastvore sa različitim udelom karvedilola koji su prikazani u tabeli 8. Razlika u procesnim parametrima za elektropredenje navedenih rastvora se javlja jer je za svaki od ovih rastvora izvršena optimizacija parametara, kako bi proces, tj. *Taylor*-ova kupa bila stabilna.

Tabela 8. Procesni parametri korišćeni u toku procesa elektropredenja za dobijanje nanovlakana

Formulacije	Protok (ml/h)	Primenjeni napon (kV)
<b>N1</b>	4	14
<b>N2</b>	2	12
<b>N3</b>	2	14
<b>N4</b>	1	11
<b>N5</b>	2	13
<b>N6</b>	1	11

Za sve eksperimentalne probe, dijametar otvora kapilare je bio 0,6 mm; a kolektor je bio postavljen na rastojanju od 15 cm. Temperatura i relativna vlažnost vazduha bile su strogo kontrolisane, 25 °C i 45%, respektivno. Rastvarač koji je korišćen za sve formulacije je smeša aceton: hloroform, 9:1 (m/m).

### 3.2.2.5 Karakterizacija nanovlakana

#### 3.2.2.5.1 Skenirajuća elektronska mikroskopija

Ispitivanje morfologije elektropredenih nanovlakana izvršeno je korišćenjem skenirajućeg elektronskog mikroskopa (Supra35 VP; Carl Zeiss, Oberkochen, Nemačka), uz povećan napon od 1 kV i sa sekundarnim detektorom elektrona. Nanovlakna su bila fiksirana na metalne pločice sa dvostrukom trakom, bez dodatnog omotača primenjenog pre slikanja. Dijametri 100 nasumično odabranih vlakana su izmereni korišćenjem ImageJ 1.44p programa (National Institutes of Health, SAD), za dobijanje srednje vrednosti dijametra nanovlakana.

#### 3.2.2.5.2 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija

Opisano u Sekciji 3.2.1.2.

### 3.2.2.5.3 Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom

FTIR spektroskopija je korišćena za kvalitativnu karakterizaciju interakcija između karvedilola i Soluplus<sup>®</sup>-a. Za dobijanje FTIR spektara karvedilola, Soluplus<sup>®</sup>-a i nanovlakna Soluplus<sup>®</sup>-a impregniranih karvedilolom, korišćena je tehnika prigušene totalne refleksije (Nexus, Thermo Nicolet, Madison, SAD), sa snimanjem spektara u opsegu od 600 cm<sup>-1</sup> do 4000 cm<sup>-1</sup>, sa rezolucijom od 2 cm<sup>-1</sup>.

### 3.2.2.5.4 *In-vitro* brzina rastvaranja (dissolution test)

Brzina rastvaranja karvedilola iz nanovlakana ispitivana je u 0,1M hlorovodoničnoj kiselini (900 ml) korišćenjem aparature sa rotirajućim lopaticama (Erweka DT 600; Hausenstamm, Nemačka). Prvo je masa uzorka nanovlakana koja sadrži 12,5mg karvedilola bila precizno odmerena i nežno postavljena u modifikovane sinkere, a potom stavljena u čašu aparature. Korišćena brzina lopatica je bila 50 rpm. Određeni alikvoti su uzimani u toku 1 h (u 5, 10, 15, 20, 30, 45 i 60 minutu) uz nadoknadu medijuma i sadržaj karvedilola određivan je UV/VIS spektrofotometrijski na talasnoj dužini 241 nm. Korišćena je jednačina (11) ( $R^2 = 0,9998$ ; linearnost u opsegu od 1 do 16 mg/l)

$$y = 0,1066 * x + 0,0134 \quad (11)$$

### 3.2.2.5.5 Određivanje sadržaja lekovite supstance u nanovlaknima

Uzorak koji je sadržao određenu količinu karvedilola (za svaki od N1-N6 po dva uzorka sa površine kolektora), rastvoren je u 25 ml 0,1M HCl, potom je izvršeno centrifugiranje i filtriranje. Nakon razblaživanja izvršeno je određivanje sadržaja karvedilola. Određivanje sadržaja karvedilola u uzorcima vršeno je UV/VIS spektrofotometrijski na UV/VIS spektrofotometru (Evolution 300; Thermo Fisher Scientific, Loughborough, SAD), na 241 nm talasne dužine korišćenjem jednačine 11.

## 3.2.3 Razvoj formulacije tableta obloženih kompresijom

### Definisanje QTPP

Definisanje ciljnog profila kvaliteta proizvoda (QTPP) je izvršeno na osnovu pregleda literature i na osnovu zahteva koje je potrebno da ispunjavaju terapijski sistemi sa pulsним

oslobađanjem karvedilola [Lawrence i sar., 2014; Patel i sar., 2013; Bussemer i sar., 2001; Youan, 2004] (tabela 9).

Tabela 9. QTPP tableta karvedilola obloženih kompresijom

QTPP elementi	Cilj	Objašnjenje
<b>Farmaceutski oblik</b>	Tablete obložene kompresijom sa pulsno oslobađanjem	Tablete kao često korišćen čvrsti farmaceutski oblik Pulsno oslobađanje jer je poželjno za hronoterapiju.
<b>Put primene</b>	Oralni put primene	Farmaceutski oblik doziran za oralni put primene.
<b>Doza</b>	12.5 mg	Uobičajeno korišćena doza.
<b>CQAs</b>	Fizički atributi  <i>Lag time</i>  <b>Q</b>	Bez fizičkih defekata (laminacija, kapingovanje itd.) Najmanje 4h odlaganja oslobađanja. Trenutno oslobađanje lekovite supstance nakon <i>lag time</i> .

U ovoj fazi, u cilju formulisanja preparata sa pulsno oslobađanjem leka, procenjivan je uticaj različitih faktora na kritične attribute kvaliteta tableta obloženih kompresijom.

Najpre je vršen razvoj formulacije tabletnog jezgra. U formulaciji tableta kao farmaceutskih oblika, preduslov za oslobađanje lekovite supstance iz tablete i njeno rastvaranje, predstavlja raspadanje same tablete. Raspadljivost jezgra i vrsta ekscipijena može imati uticaj na profil oslobađanja lekovite supstance i na *lag time* [Lin i sar., 2002]. Imajući ovo u vidu, procenjivan je uticaj superdezintegratora i osmotski aktivnih pomoćnih supstanci na proces oslobađanja karvedilola iz tabletnih jezgara i tableta obloženih kompresijom, tj. ispitivan je njihov uticaj na CQAs. Polietilen oksidni polimeri su korišćeni u cilju postizanja efekta odlaganja oslobađanja karvedilola. Polietilenoksidni polimeri predstavljaju hidrofilne polimere koji se dobijaju hemijskim putem, polimerizacijom etilen oksidnih jedinica. Mogu biti različitih molekularnih masa [Ma i

sar., 2014]. Polietilen oksidi su hidrofilni, tj. termodinamički kompatibilni sa vodom, linearni polimeri čiji lanci nisu unakrsno povezani. Kada dospeju u kontakt sa vodom polimerni lanci počinju da bubre, usled stvaranja vodoničnih veza između polimera i molekula vode. S obzirom da se radi o polimerima nejonske prirode, za očekivati je da ne ispoljavaju bilo kakve interakcije sa lekovitim odnosno pomoćnim supstancama u njihovom okruženju. PEO polimeri formiraju karakteristični gel u kontaktu sa medijumom i upravo taj gel omotač je odgovoran za kontrolu brzine rastvaranja lekovite supstance, što je iskorišćeno za kontrolu oslobađanja lekovite supstance [Repka i sar., 2013]. U literaturi postoje podaci o uspešnom korišćenju PEO polimera u procesu formulacije tableta obloženih kompresijom zahvaljujući njihovoj osobini da su direktno kompresibilni [Hariharan i Gupta, 2001; Sawada i sar., 2004; Sawada i sar., 2003; Ambedkar Sunil i sar., 2013; Ma i sar, 2014].

Sastav svih izrađenih formulacija naveden je u tabeli 11. Tabletna jezgra za formulacije F1-F6 imala su masu 200 mg i izrađena su korišćenjem alata dijametra 9 mm, ostala tabletna jezgra su imala masu 150 mg, a korišćen je alat 6 mm. Sastav tabletnih jezgara (Fj1-Fj6) dat je u tabeli 10. Omotač svih tableta imao je masu 1:2 u odnosu na tabletno jezgro, pri čemu je za formulacije F1-F6, za oblaganje kompresijom korišćen alat dijametra 12 mm, dok je za ostale formulacije korišćen alat 9 mm.

Tabela 10. Sastav tabletnih jezgara (F1j-F6j)

Formulacije	Sastav jezgra	Masa (mg)
Fj1	Karvedilol Magnezijum-stearat Ludipress	12,5 1,5 185,5
Fj2	Karvedilol SSG Magnezijum-stearat Laktoza monohidrat MCC	12,5 24 1,5 56 56
Fj3	Karvedilol Krospovidon, Magnezijum-stearat Laktoza monohidrat MCC	12,5 24 1,5 56 56
Fj4	Karvedilol NaCl Magnezijum-stearat Laktoza, anhidrovana	12,5 15 1,5 121
Fj5	Karvedilol Manitol Magnezijum-stearat Laktoza, anhidrovana	12,5 30 1,5 106,5
Fj6	Nanovlakna (Soluplus <sup>®</sup> -Karvedilol (1:1)) Magnezijum-stearat Laktoza, anhidrovana	25 1,5 123,5



Tabela 11. Sastav izrađenih tabletnih formulacija

Formulacije	Formulacija tabletnog jezgra									Formulacija tabletnog omotača				
	Karvedilol 12,5mg	SSG	CP	NaCl	Manitol	Magnezijum stearat 1%	Ludipress®	Laktoza, anhidrovana	Laktoza monohidrat + MCC	Polyox® WSR Coagulant	Polyox® WSR 301	Polyox® WSR N60K	MCC	Laktoza, monohidrat
<b>F1</b>	+					+	+			80%			+	
<b>F2</b>	+					+	+				80%		+	
<b>F3</b>	+					+	+					80%	+	
<b>F4</b>	+					+	+					10%	+	
<b>F5</b>	+					+	+					20%	+	
<b>F6</b>	+					+	+					30%	+	
<b>F7</b>	+	16%				+			+			30%	+	
<b>F8</b>	+		16%			+			+			30%	+	
<b>F9</b>	+	16%				+			+			35%	+	
<b>F10</b>	+		16%			+			+			35%	+	
<b>F11</b>	+	0%		0%		+		+				35%		+
<b>F12</b>	+	10%		0%		+		+				35%		+
<b>F13</b>	+	0%		10%		+		+				35%		+
<b>F14</b>	+	10%		10%		+		+				35%		+
<b>F15</b>	+				20%	+		+				30%		+
<b>F16</b>	+				50%	+		+				30%		+
<b>F17</b>	+				20%	+		+				35%		+
<b>F18</b>	+				50%	+		+				35%		+

Priprema tabletnih jezgara i oblaganje kompresijom vršeno je na ekscenter tablet mašini (Korsch EK0, Berlin, Nemačka). Faza pripreme tabletnih jezgara podrazumevala je odmeravanje potrebne mase karvedilola i pomoćnih supstanci i ručno mešanje u tarioniku pomoću pistila, odnosno odmeravanje, ručno usitnjavanje nanovlakana na sitnije delove i blago mešanje sa puniocem u tarioniku. Tabletna jezgra su pripremana koristeći alate ravne površine dijametra 6 i 9 mm. U sledećem koraku, pripremana je smeša odgovarajućih pomoćnih supstanci koje su ulazile u sastav omotača tableta. Na aluminijskoj foliji su odmeravane mase koje odgovaraju polovini mase omotača tablete (uz odgovarajuće odstupanje). Potom, podešen je donji položaj alata na ekscenter tablet mašini i u tabletnu matricu (dijametra 9 ili 12 mm), stavljana je polovina mase smeše za omotač tableta, uz pažljivo ravnjanje površine. Prethodno pripremljena tabletna jezgra su pincetom stavljana na površinu praška u matrici i pažljivo centrirana. Nakon toga, druga polovina mase smeše za omotač tableta je dodavana u matricu tablet mašine i vršen je finalni korak, tj. kompresija i oblaganje tableta. Svim izrađenim tabletama su merene masa i debljina upotrebom analitičke vage i nonijusa.

### 3.2.3.1 Karakterizacija tableta

#### 3.2.3.1.1 *In vitro* ispitivanje brzine rastvaranja karvedilola iz tableta

Za određivanje brzine rastvaranja karvedilola iz tabletnih jezgara i obloženih tableta korišćena je metoda opisana u sekciji 3.3.2.5.4. Uzorci su uzimani u toku 1h u sledećim vremenskim intervalima (10, 20, 30 i 45 minuta) u slučaju ispitivanja brzine rastvaranja karvedilola iz tabletnih jezgara, a u slučaju obloženih tableta, uzorci su uzimani na svakih 30 minuta tokom 8h trajanja testa uz nadoknadu medijuma i sadržaj karvedilola određivan je UV/VIS spektrofotometrijski na talasnoj dužini 241 nm korišćenjem jednačine 11..

### 3.2.3.2 Procena rizika

#### 3.2.3.2.1 Inicijalna procena rizika

Preliminarna analiza rizika podrazumeva navođenje svih faktora koji mogu uticati na kvalitet proizvoda i grupisanje tih faktora u određene kategorije. Preliminarna (inicijalna) analiza rizika je izvršena na osnovu literaturnih podataka, prethodnih eksperimentalnih rezultata i iskustva. U ovoj fazi, najpre je izvršeno hijerarhijsko organizovanje identifikovanih rizika u formi dijagrama riblje kosti (engl. *Fish bone*). Pored ovog načina,

primenjena je i kategorizacija rizika sa potencijalnim uticajem na karakteristike kvaliteta završnog proizvoda na tri kategorije koje su kvalitativno opisane (nizak, srednji i visok rizik).

#### 3.2.3.2.2 Analiza efekata u slučaju neizvršenja – FMEA tablete obložene kompresijom

Prvi korak u izvođenju FMEA analize jeste identifikacija potencijalnih neizvršenja tj. odstupanja (engl. *failure*). Za svaki pobrojani atribut materijala ili procesni parametar se najpre definiše potencijalno neizvršenje (odstupanje, neusaglašenost) u odnosu na praćenu CQAs. Potencijalna odstupanja su definisana i potom im je dodeljen odgovarajući skor na osnovu tri aspekta svakog odstupanja: verovatnoća pojave odstupanja (*Occurrence-O*), ozbiljnost (*Severity-S*), i mogućnost detekcije (*Detectability-D*). Svaki od ovih aspekata odstupanja može biti opisan kvalitativno, pri čemu je svakom kvalitativnom opisu, dodeljena numerička vrednost definisana skalama različitog opsega, koji se definiše na osnovu literaturnih podataka ili iskustva. U slučaju verovatnoće pojavljivanja neusaglašenosti, tj. odstupanja, za svaki opis, data je i brojčano predstavljeno verovatnoća (tabela 12), radi bolje kategorizacije i razlikovanja odstupanja, a potom im je dodeljena numerička vrednost skale koja je korišćena za izračunavanje RPN vrednosti u samom softveru. Skale za verovatnoću, ozbiljnost i mogućnost detekcije neizvršenja date su u tabeli 12. Nakon dodeljivanja ovih vrednosti, vrši se izračunavanje RPN vrednosti i na osnovu tih vrednosti se vrši rangiranje faktora.

Tabela 12. Definisane skale za kategorizaciju potencijalnih neizvršenja i njihovih efekata

Značajnost efekta	Skala	Verovatnoća pojavljivanja		Skala	Mogućnost detekcije	
Beznačajna	1	Slaba	$\leq 1 \cdot 10^{-5}$	1	Skoro sigurna	1
Marginalna	2	Mala	$1 \cdot 10^{-4}$	2	Veoma visoka	2
Kritična	3	Mala	$5 \cdot 10^{-4}$	3	Visoka	3
Katastrofalna	4	Srednja	$1 \cdot 10^{-3}$	4	Srednje visoka	4
		Srednja	$2 \cdot 10^{-3}$	5	Srednja	5
		Srednja	$5 \cdot 10^{-3}$	6	Mala	6
		Visoka	$1 \cdot 10^{-2}$	7	Veoma mala	7
		Visoka	$2 \cdot 10^{-2}$	8	Slaba	8
		Veoma visoka	$5 \cdot 10^{-2}$	9	Veoma slaba	9
		Veoma visoka	$\geq 1 \cdot 10^{-1}$	10	Apsolutno neizvesno	10

Na samom kraju je izvršeno definisanje kritične vrednosti RPN, i podela faktora prema njihovom stepenu (visokog i niskog rizika). Korišćen je RXpress<sup>®</sup> softverski paket za sprovođenje FMEA (Educe Global Inc., SAD). U okviru analize definisane su dve faze, kompresija jezgra i oblaganje jezgra, tj. finalna kompresija, za dobijanje obloženih tableta. Definisani su atributi materijala i procesni parametri, a takođe su definisani i kritični atributi kvaliteta proizvoda (CQAs). U tabeli 13, sumirani su procesni parametri i atributi materijala koji su ispitivani FMEA analizom.

Tabela 13. Atributi materijala i procesni parametri za tablete obložene kompresijom

Atributi materijala	Procesni parametri
Koncentracija natrijum-skrobglikolata (SSG)	Sila kompresije jezgra
Koncentracija kospovidona (CP)	Centriranje jezgra
Koncentracija manitola	Sila kompresije za oblaganje tableta
Tip punioca	
Koncentracija natrijum-hlorida (NaCl)	
Molekulska masa polimera	
Koncentracija Polyox WSR N60K	

Kritični atributi kvaliteta (CQAs) i njihovo objašnjenje za tablete karvedilola obložene kompresijom dati su u tabeli 14. Budući da se radi o hronoterapijskim sistemima sa pulsним oslobađanjem karvedilola, bitna karakteristika je *lag time*, tj. vreme odlaganja oslobađanja. Takođe, važna je ukupna količina oslobođene lekovite supstance iz obloženih tableta. Brzina rastvaranja karvedilola iz jezgara bi trebalo da zadovolji zahteve za trenutno oslobađanje lekovite supstance, ali uzima se u razmatranje kao jedan od kritičnih atributa kvaliteta finalnog proizvoda, jer interakcija omotača i jezgra može dovesti do neadekvatnog oslobađanja karvedilola nakon *lag time*.

Tabela 14. CQAs za tablete obložene kompresijom

<b>Kritični atributi kvaliteta (CQAs)</b>	<b>Objašnjenje CQAs</b>
<i>q</i>	Brzina rastvaranja karvedilola iz tabletnih jezgara
<i>Lag time</i>	Vreme odlaganja početka oslobađanja karvedilola (vreme bez oslobađanja lekovite supstance)
<i>Q</i>	Brzina rastvaranja karvedilola iz obloženih tableta

## 4.0 Rezultati i diskusija

### 4.1 Određivanja stepena mešanja karvedilola i Soluplus®-a

Najpre je vršena procena stepena mešanja lekovite supstance karvedilola i izabranog amfifilnog polimera, Soluplus®-a. Ovaj polimer je inovativan ekscipijens koji ima amfifilnu strukturu gde su savršeno iskombinovan polimer i solubilizator u jednom proizvodu. Molekulska masa Soluplus®-a je optimizovana za višu stabilnost amorfnih čvrstih disperzija, dok je temperatura staklastog prelaza optimizovana za lakšu primenu polimera [BASF, 2019]. Za procenu stepena mešanja karvedilola i Soluplus®-a odabrane su dve metode. Kvalitativna metoda, kao prvi korak, koja će nam preliminarno pokazati da li postoji verovatnoća za mešanje ove dve komponente, na osnovu izračunavanja razlike njihovih ukupnih parametara rastvorljivosti  $\Delta\delta_t$ . Parametri rastvorljivosti za Soluplus® su dostupni u literaturi i nije ih bilo potrebno računati, dok je za karvedilol primenjena *Stefanis-Panayiotou* metoda za njihovo izračunavanje jer se ne navode u literaturi. Najpre je izvršena fragmentacija strukturne formule karvedilola, prema literaturnim podacima, na osnovne fragmente i izvršeno je njihovo kategorisanje u grupe prvog i drugog reda (tabela 3 i 4) [Stefanis i Panayiotou, 2008; 2012]. Grupe prvog i drugog reda u molekulu karvedilola i pripadajući parcijalni parametri rastvorljivosti prikazani su u tabeli 15 i tabeli 16.

Potom, primenom *Stefanis-Panayiotou* metode, izračunati su parcijalni parametri rastvorljivosti karvedilola  $\delta_d$ ,  $\delta_p$  i  $\delta_h$  (jednačine 4, 5, 6) [Stefanis and Panayiotou, 2012]. Ukupni parametar rastvorljivosti karvedilola  $\delta_t$  izračunat je kao kvadratni koren zbira kvadrata parcijalnih parametara rastvorljivosti (jednačina 3), predstavljenih u tabeli 17 i na slici 9.

Tabela 15. Parcijalni parametri rastvorljivosti i ponavljanje za grupe prvog reda

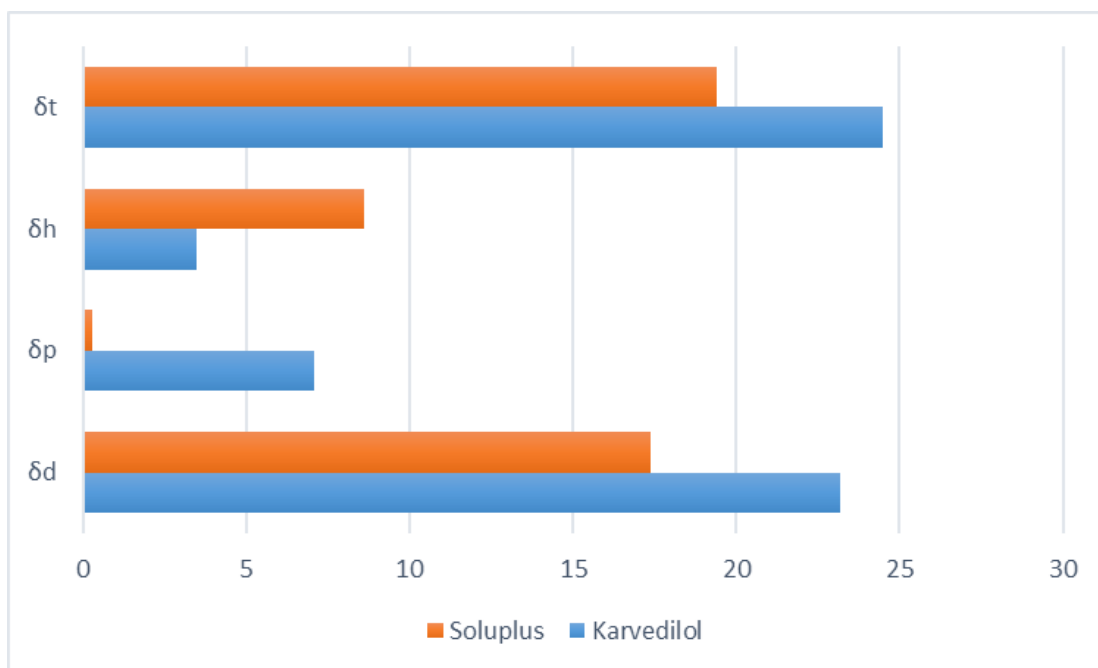
Grupe prvog reda	Parcijalni parametri rastvorljivosti (doprinosi grupa $C_i$ )			Ponavljanje $N_i$
	$\delta_d$	$\delta_p$	$\delta_h$	
<b>ACH</b>	29,87	-0,5771	-0,3554	11
<b>AC</b>	98,84	0,7661	-0,1553	7
<b>OH</b>	-29,97	1,0587	7,3609	1
<b>-OCH3</b>	-68,07	0,0089	0,2676	1
<b>-CH3</b>	-123,01	-1,6444	-0,7458	1
<b>CH2O-</b>	13,40	0,8132	-0,1196	2
<b>-CH2-</b>	1,82	-0,3141	-0,3877	4
<b>-CH&lt;</b>	82,94	0,6051	-0,2064	1
<b>CH2NH</b>	96,18	0,2616	1,4053	1
<b>N</b>	-10,55	-0,1692	-5,3820	1
<b><math>\sum N_i C_i</math></b>	1002,05	-0,4947	-4,0869	

Tabela 16. Parcijalni parametri rastvorljivosti i ponavljanje za grupe drugog reda

Grupe drugog reda	Parcijalni parametri rastvorljivosti (doprinosi grupa $D_j$ )			Ponavljanje $M_j$
	$\delta_d$	$\delta_p$	$\delta_h$	
<b>-C(OH)C(N)</b>	-7,03	0,8750	-0,7322	1
<b>AC-O-C</b>	35,82	0,7781	0,6689	1
<b>&gt;NH</b>	53,29	-1,6876	-0,0132	1
<b><math>\sum M_j D_j</math></b>	82,08	-0,0345	-0,0765	

**Tabela 17. Parametri rastvorljivosti karvedilola i Soluplus®-a**

	Parametri rastvorljivosti (MPa <sup>1/2</sup> )			
	$\delta_d$	$\delta_p$	$\delta_h$	$\delta_t$
Karvedilol	23,2	7,1	3,5	24,5
Soluplus®	17,4	0,3	8,6	19,4



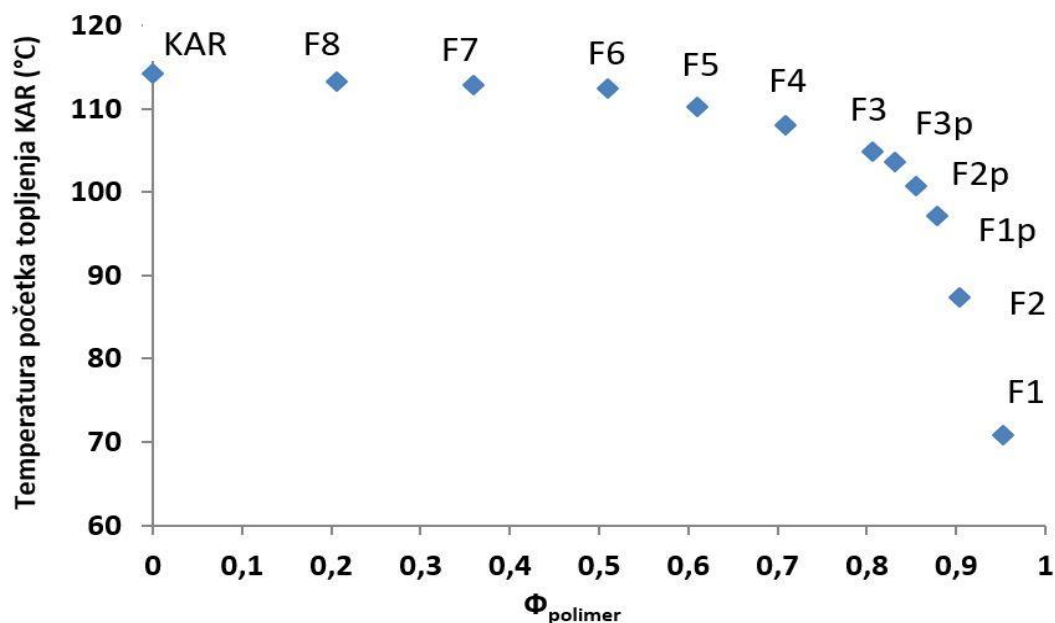
Slika 9. Parametri rastvorljivosti karvedilola i Soluplus®-a

Kada su dobijeni parametri rastvorljivosti karvedilola, bilo je moguće izračunati razliku ukupnog parametra rastvorljivosti karvedilola i Soluplus®-a (jednačina 3). Dobijena vrednost  $\Delta\delta_t$  je 5,1 MPa<sup>1/2</sup>. Ova vrednost ukazuje da postoji verovatnoća da u sistemu ove dve komponente dolazi do njihovog međusobnog mešanja, jer se za vrednosti  $\Delta\delta_t < 7,0$  MPa<sup>1/2</sup>, smatra da postoji velika verovatnoća za mešanje komponentata, dok vrednosti  $\Delta\delta_t > 10,0$  MPa<sup>1/2</sup> ukazuju da u sistemu ne dolazi do mešanja, tj. verovatnoća za mešanje komponentata je mala [Greenhalgh i sar., 1999]. Na osnovu vrednosti njihovih parcijalnih parametara rastvorljivosti, može se pretpostaviti dominantnost interakcija koje potiču od disperzionih sila i vodoničnih veza, tj. da su ta dva tipa interakcija dominantna. Kao što je već rečeno, ova kategorizacija nije precizna, sama metoda je kvalitativne prirode, i ima



svoje nedostatke. Li i Chiappeta su pokazali da, iako su komponente imale slične parametre rastvorljivosti, to nije dovelo do njihovog mešanja u sistemu, i zato su zaključili da ova metoda, odnosno sličnost parametara rastvorljivosti, ne može bezuslovno ukazivati na mešanje komponenata [Li i Chiappeta, 2008]. Istraživanja su, takođe, pokazala još jedno ograničenje primene ove metode i to na ograničenje njegove primene na sisteme u otopljenom stanju, jer se određene osobine polimera, kao što je viskozitet, mogu značajno promeniti tokom termalnih promena [Liu i sar., 2013].

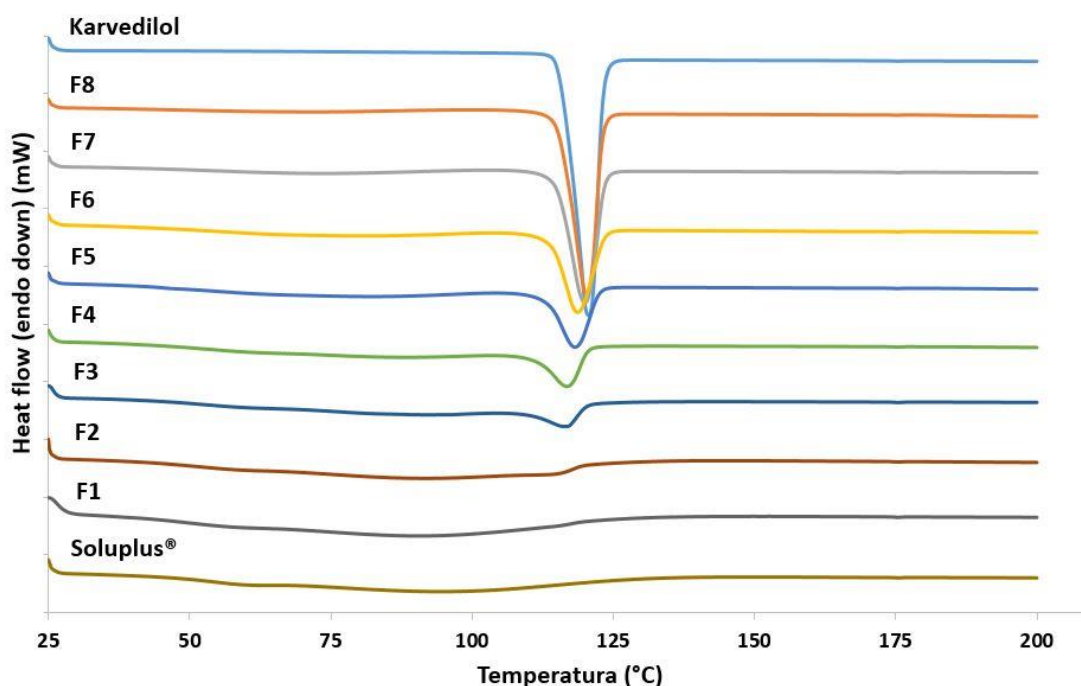
Zato je u sledećem koraku prve faze eksperimentalnog istraživanja primenjena kvantitativna metoda za procenu stepena mešanja karvedilola i Soluplus<sup>®</sup>-a. Izabrana metoda, bazirana na *Flory-Huggins* teoriji rešetke, podrazumevala je određivanja *Flory-Huggins* interakcionog parametra  $\chi$ . Ovaj parametar određen je metodom procene smanjenja tačke topljenja. Najpre su pripremljene fizičke smeše karvedilola i Soluplus<sup>®</sup>-a (tabela 5). Potom su dobijeni termogrami ovih smeša, kao i čistog karvedilola i Soluplus<sup>®</sup>-a. Početak topljenja karvedilola, tj. temperatura početka topljenja karvedilola određena je na osnovu ovih termograma. Na slici 10 prikazana je zavisnost početne tačke topljenja karvedilola (KAR) od masenog udela polimera u smeši ( $\phi_{\text{polimer}}$ ).



Slika 10. Zavisnost temperature početka topljenja karvedilola u funkciji masenog udela polimera u smeši

Inicijalni rezultati procene promene temperature početka topljenja karvedilola, u zavisnosti od udela polimera u fizičkim smešama, pokazala je da sa povećanjem udela Soluplus®-a dolazi do smanjenja početne temperature topljenja. Ove promene na endotermama topljenja ukazuju da dolazi do mešanja lekovite supstance i polimera, pri čemu se prilikom zagrevanja karvedilol može i otapati i rastvoriti u otopljenom polimeru. Budući da se najveća razlika, tj. promena početne temperature topljenja karvedilola primećuje između formulacija F2 i F3, gde je udeo karvedilola 10 i 20% respektivno, razmatrane su dodatne tri formulacije (F1p, F2p i F3p) radi detaljnijeg i preciznijeg uvida u promene koje se dešavaju u ovoj oblasti (tabela 5).

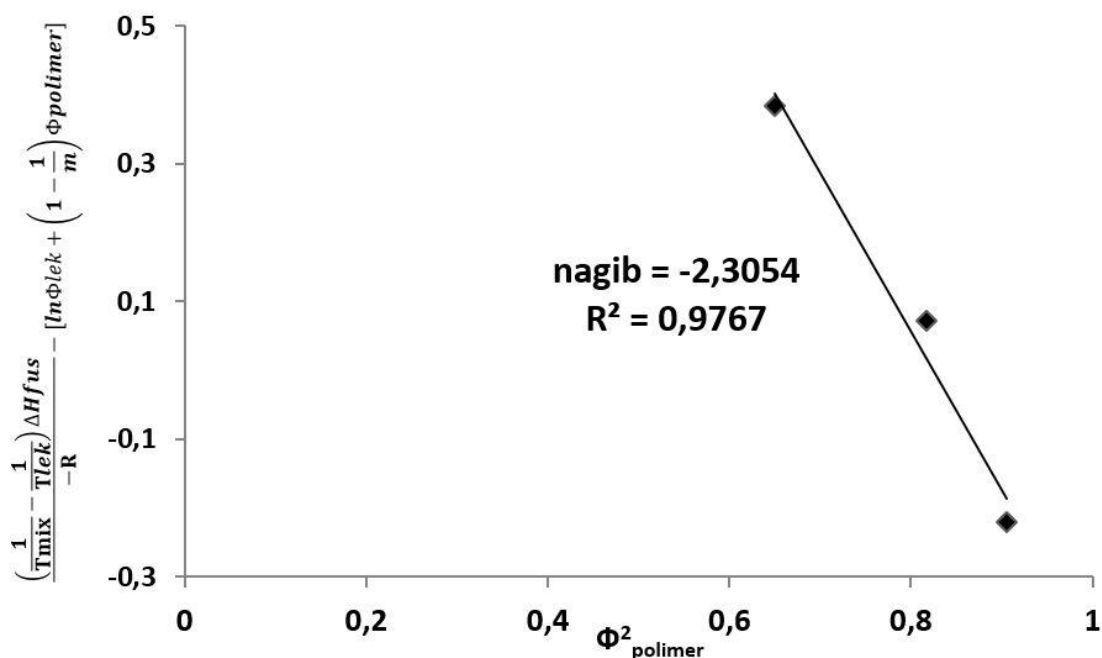
Opadajući trend početne temperature topljenja karvedilola potvrđen je kroz promene koje se uočavaju posmatranjem DSC termograma (slika 11).



Slika 11. DSC termogrami karvedilola, fizičkih smeša i Soluplus®-a

Negativne vrednosti izračunatog interakcionog parametra ukazuju da dolazi do mešanja komponenata, dok pozitivne vrednosti pokazuju da se komponente ne mešaju. Kvantitativno, što su veće negativne vrednosti interakcionog parametra, veći je stepen mešanja komponenata [Marsac i sar., 2006; Meng i sar., 2015]. Na slici 12 predstavljena je linearna zavisnost članova jednačine 7, pri čemu je nagib krive interakcioni parametar.

Linearnost ove krive pokazana je za oblast definisanu sa tri tačke, tj. tri koncentracije polimera. Smanjenjem koncentracije Soluplus<sup>®</sup>-a, odnosno povećanjem koncentracije karvedilola linearnost se gubi. Vrednost izračunatog interakcionog parametra je -2,3054; što ukazuje da se karvedilol i Soluplus<sup>®</sup> mešaju, tj. pokazuje da su adhezivne interakcije jače od kohezivnih.



Slika 12. Primena linearne regresione analize za izračunavanje *Flory-Huggins* interakcionog parametra

Marsac i saradnici su korišćenjem ove metode odredili interakcioni parametar za procenu stepena mešanja povidona i dve lekovite supstance (nifedipin i felodipin). Dobijene vrednosti interakcionog parametra (-3,8 i -4,2; respektivno) ukazale su da dolazi do mešanja ovih lekovitih supstanci sa polimerom, ali su takođe pokazali i veću tačnost i pouzdanost ove metode u odnosu na određivanje interakcionog parametra korišćenjem parametara rastvorljivosti [Marsac i sar., 2006]. Altamimi i Neau su ispitivali stepen mešanja nifedipina i sulfametoksazola sa Soluplus<sup>®</sup>-om na osnovu vrednosti interakcionog parametra. Pokazali su da negativnija vrednost interakcionog parametra podrazumeva veći stepen mešanja, tj. sulfametoksazol se bolje meša sa polimerom od nifedipina (-2,9437 u odnosu na -1,2998). Oni su takođe pokazali da se u ovoj metodi

može koristiti i temperatura završetka topljenja za određivanje interakcionog parametra [Altamimi i Neau, 2016].

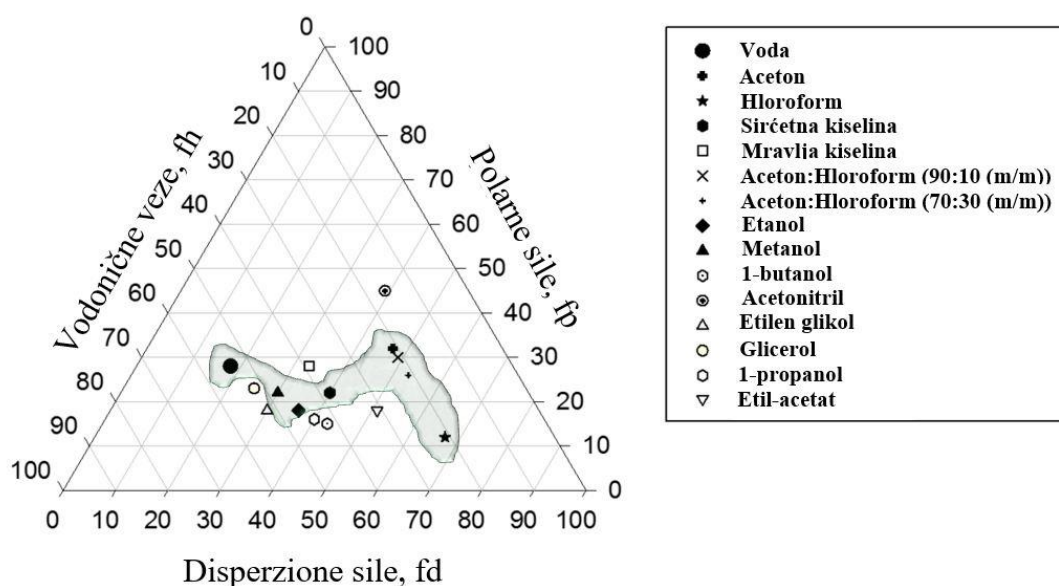
## 4.2 Dobijanje nanovlakana Soluplus<sup>®</sup>-a impregniranih karvedilolom

### 4.2.1 Mapiranje oblasti rastvorljivosti Soluplus<sup>®</sup>-a na *Teas* grafiku

Nakon završetka prve faze eksperimentalnog istraživanja, i potvrde mešanja karvedilola i Soluplus<sup>®</sup>-a u čvrstim disperzijama, u sledećoj fazi eksperimentalnog rada vršen je razvoj formulacije nanovlakana kaarvedilola i Soluplus<sup>®</sup>-a, tj. nanovlakana Soluplus<sup>®</sup>-a koja su nosač za karvedilol. Izbor rastvarača za proces elektropredenja jeste jedan od ključnih faktora koji mogu uticati na sam proces i dobijena vlakna, i neophodno je izabrati odgovarajući rastvarač sa aspekta kompatibilnosti sa polimerom, lekovitom supstancom i samim procesom elektropredenja [Bhardwaj i Kundu, 2010]. Rastvorljivost polimera u rastvaračima može biti preuzeta iz literature ili eksperimentalno određena, što može predstavljati problem ukoliko se radi o velikom broju potrebnih podataka. Zato je formiranje regiona rastvorljivosti pristup koji omogućava da se, na osnovu parametara rastvorljivosti manjeg broja rastvarača, formira region rastvorljivosti za konkretni polimer, koji će služiti kao baza podataka za rastvorljivost tog polimera u bilo kom rastvaraču, samo na osnovu njihove pozicije na grafiku, koja je definisana parametrima rastvorljivosti [Luo i sar., 2010]. Na slici 13 prikazan je ternarni dijagram, odnosno *Teas* grafik, na kome su različitim simbolima označeni rastvarači na osnovu njihovih frakcionih parametara rastvorljivosti. Osenčeni region predstavlja oblast u kojoj se nalaze rastvarači koji rastvaraju polimer Soluplus<sup>®</sup>. U ovoj fazi ispitivani su često upotrebljavani rastvarači u farmaceutskoj industriji, rastvarači različite polarnosti i karakteristika, i različitih parametara rastvorljivosti kako bi se dobila preciznija slika, tj. kako bi se odredila oblast rastvorljivosti polimera na grafiku. Cilj ovog mapiranja jeste bilo obeležavanje oblasti rastvorljivosti Soluplus<sup>®</sup>-a, na osnovu parametara rastvorljivosti određenog broja rastvarača, pri čemu se podatak o rastvorljivosti Soluplus<sup>®</sup>-a u drugim rastvaračima može dobiti na osnovu njihovih parametara rastvorljivost.

Kada se za određeni polimer ispituje njegova rastvorljivost u različitim rastvaračima, pozicija bilo kog rastvarača na ternernom dijagramu je jedinstvena i nepromenljiva, ukoliko se ostali parametri kao što su koncentracija, temperatura i pritisak održavaju konstantnim, i tada rastvorljivost polimera može biti prikazana na ternernom dijagramu.

Empirijski je proverena rastvorljivost Soluplus<sup>®</sup>-a u odabranim rastvaračima (tabela 6). Empirijski određena oblast rastvorljivosti, tj. oblast rastvarača na grafiku, obezbeđuje značajne podatke za odabir rastvarača koji može rastvoriti polimer i tako biti upotrebljiv za proces elektropredenja [Luo i sar., 2010]. Tokom samog testiranja, tj. praćenja procesa rastvaranja Soluplus<sup>®</sup>-a u toku 24 časa, uočeno je parcijalno ili potpuno rastvaranje Soluplus<sup>®</sup>-a u rastvaračima, uglavnom zahvaljujući njegovim amfifilnim karakteristikama. Na slici 13, na osnovu frakcionih parametara rastvorljivosti, pozicionirano je svih 15 ispitivanih rastvarača (tabela 6). Ispunjeni simboli predstavljaju rastvarače u kojima je Soluplus<sup>®</sup> visoko rastvorljiv, dok su neispunjeni simboli rastvarači u kojima je Soluplus<sup>®</sup> delimično rastvorljiv. Na ternarnom dijagramu označen je region, osenčena oblast, u kojoj se nalaze rastvarači u kojima Soluplus<sup>®</sup> polimer jeste rastvoran (8 rastvarača) (slika 13).



Slika 13. Mapirani region rastvorljivosti Soluplusa na ternarnom grafiku

Posmatranjem vrednosti frakcionih parametara rastvoljivosti ovih 8 rastvarača u kojima je Soluplus<sup>®</sup> eksperimentalno pokazao rastvorljivost, može se zaključiti da od interakcija dominiraju disperzione sile i vodonične veze (tabela 18).

Tabela 18. Frakcioni parametri rastvorljivosti ( $f_d$ ,  $f_p$  i  $f_h$ ) za Soluplus<sup>®</sup> i rastvarače iz osenčene oblasti na ternarnom grafiku

Rastvarači	$f_d$	$f_p$	$f_h$
Aceton	47	32	21
Hloroform	67	12	21
Aceton:Hloroform (90:10 m/m)	49	30	21
Aceton:Hloroform (70:30 m/m)	53	26	21
Etanol	36	18	46
Metanol	30	22	48
Sirćetna kiselina	40	22	38
Voda	18	28	54
Soluplus <sup>®</sup>	66	1	33

#### 4.2.2 Formulacija rastvora za elektropredenje

Osenčena oblast na ternernom dijagramu predstavlja region rastvorljivosti Soluplus<sup>®</sup> polimera. Međutim, odabrani rastvarač za proces elektropredenja ne treba samo da rastvara polimer, već je potrebno da zadovolji i još neke karakteristike i preduslove [Potrč i sar., 2015]. Zato su, u sledećoj fazi, rastvarači detaljnije ispitivani. Jedan od parametara koji je važan za proces elektropredenja je dielektrična konstanta. Za ispitivane rastvarače, dielektrične konstante (relativne) su ili pronađene u literaturi, dok su za mešavine rastvarača dielektrične konstante izračunate [Smallwood, 2012], tabela 19. Rastvarači sa izuzetno visokom dielektričnom konstantom ( $>35$ ) ili veoma niskom ( $<15$ ), kao što su voda, sirćetna kiselina, hloroform, su izostavljeni iz daljeg istraživanja na osnovu problema pomenutih u literaturi ili uočenih u toku eksperimentalnog rada, kao što su zasušivanje polimera na igli ili začepeljavanje igle (tabela 19). Takođe je za eliminisanje navednih rastvarača uzet u razmatranje i podatak iz literature da su dobijena polikaprolaktonska vlakna dijametara manjih od 100 nm kada su korišćeni rastvarači čija je dielektrična konstanta bila približno 19 [Luo i sar., 2012].

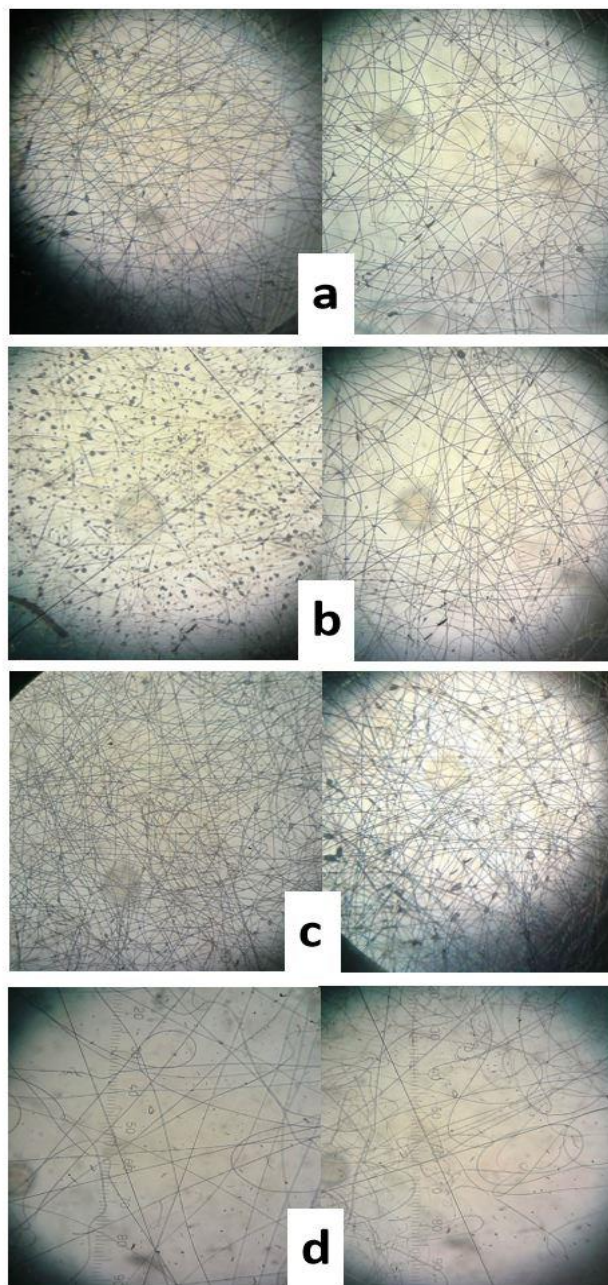
Tabela 19. Dielektrične konstante rastvarača odabranih za dalje razmatranje

<b>Rastvarači</b>	<b>Dielektrična konstanta (<math>\epsilon_r</math>)</b>
Aceton	20,60
Hloroform	4,90
Aceton: Hloroform (90:10 (m/m))	19,03
Aceton: Hloroform (70:30 (m/m))	15,89
Etanol	24,50
Metanol	32,60
Sirćetna kiselina	6,20
Voda	79,00

Poslednja faza odabira rastvarača bazirana je na rastvorljivosti karvedilola. Nakon eliminacije rastvarača čija dielektrična konstanta nije bila pogodna sa aspekta elektropredenja, ostalo je pet rastvarača/smeša rastvarača od interesa, u kojima se, na osnovu literaturnih podataka, karvedilol rastvara, tako da su na kraju ove faze, izabrani sledeći rastvarači (aceton, etanol, metanol, kao i smeša acetona i hloroforma u odnosu 90:10 (m/m) i 70:30 (m/m)), na osnovu rastvorljivosti Soluplus<sup>®</sup>-a i karvedilola, kao i na osnovu njihovih dielektričnih konstanti, koja je bitna za proces elektropredenja i karakteristike dobijenih vlakana [Pelipenko i sar., 2015]. Pogodnost izabranih rastvarača u daljem toku istraživanja bila je procenjena sprovođenjem procesa elektropredenja. U literaturi je opisan uticaj različitih rastvarača na mogućnost elektropredenja polistirenskog rastvora, ali ne postoje podaci o proceni pogodnosti rastvarača sa aspekta elektropredenja i izabrane lekovite supstance [Jarusuwannapoom i sar., 2005]. Rastvori 20% (m/m) Soluplus<sup>®</sup>-a u izabranim rastvaračima (tabela 6), elektropredeni su pod sledećim procesnim parametrima i uslovima (protok 1-5ml/h; napon 10-15kV, rastojanje kolektora 15cm; dijametar otvora igle 0,6mm; temperatura 25°C, relativna vlažnost vazduha 45 %), u cilju procene pogodnosti rastvarača sa aspekta stabilnosti *Taylor*-ove kupa, a potom i sa aspekta izgleda samih vlakana posmatranih pod optičkim mikroskopom, gde je praćeno prisustvo proširenja na vlaknima (engl. *beading*). Procesni parametri su za svaki rastvor podešavani tako da *Taylor*-ova kupa bude stabilna, a potom je pogodnost i prihvatljivost rastvarača, tj. rastvora pokazana posmatranjem vlakana pod



optičkim mikroskopom (slika 14). Bitno je reći da su ambijentalni uslovi bili kontrolisani, budući da su različite studije pokazale da ovi parametri značajno utiču na karakteristike dobijenih vlakana, kao i na sam proces elektropredenja [Pelipenko i sar., 2013a; Pelipenko i sar., 2015].



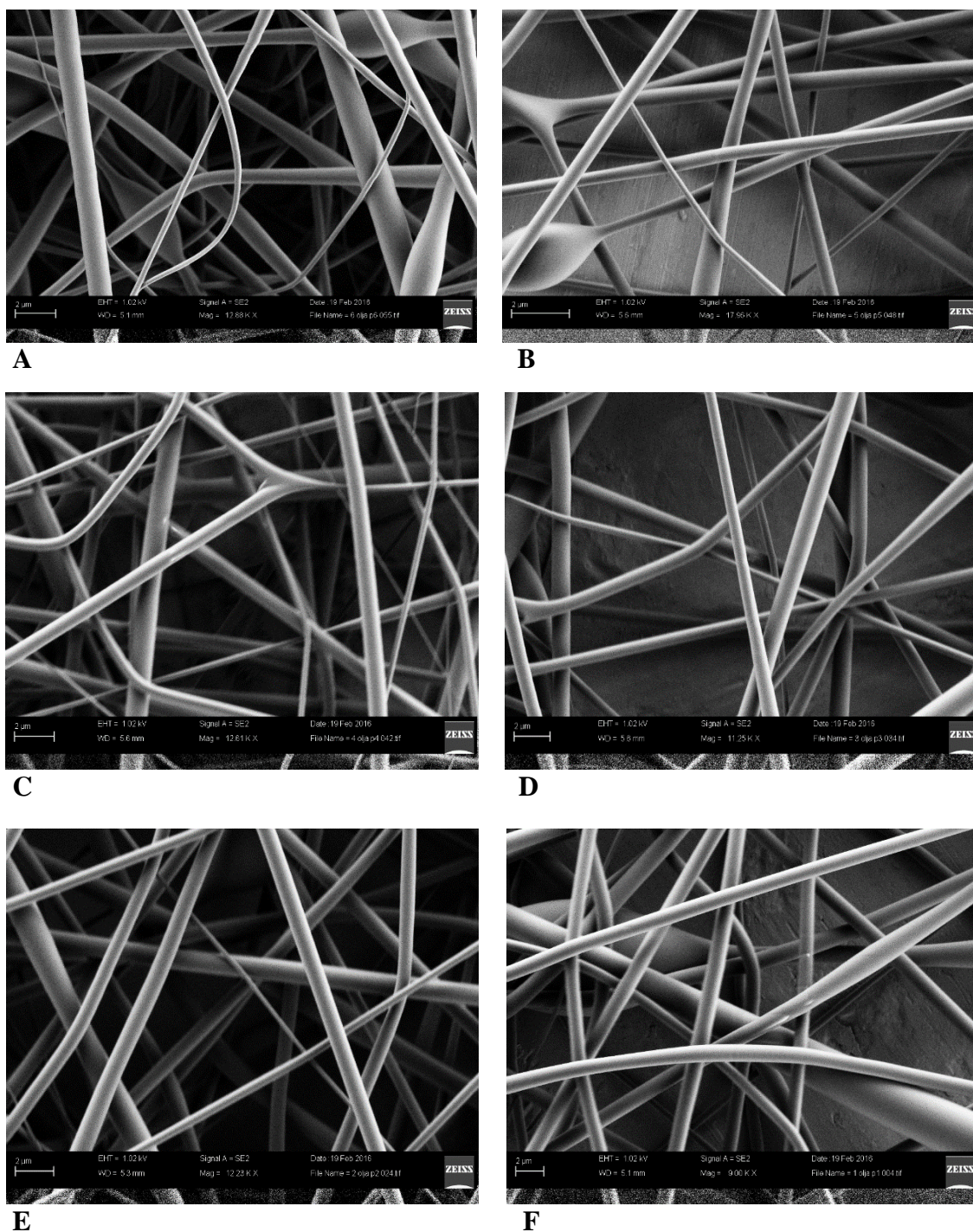
Slika 14. Reprezentativna vlakna Soluplus<sup>®</sup>-a posmatrana pod optičkim mikroskopom korišćenjem različitih rastvarača: a) etanol; b) metanol; c) aceton; d) aceton:hlorofom (90:10, m/m); aceton: hloroform (90:10 m/m).

Rastvor sa čistim acetonom kao rastvaračem eliminisan je zbog velike brzine isparavanja, što je rezultiralo povremenom sušenju vlakana na vrhu igle pri elektrospredanju, kao i zbog nestabilnosti procesa, dok je hloroform eliminisan zbog toksičnosti. Pojava proširenja na vlaknima (engl. *beads-on-a-string morphology*) koja je bila uočljiva kod rastvora metanola i etanola, posledica je veće razlike između parametara rastvorljivosti Soluplus<sup>®</sup>-a i ovih rastvarača u odnosu na ostale ispitivane, na šta je već ukazano u literaturi [Wannatong i sar., 2004]. Naelektrisanja prisutna tokom elektrospredanja imaju veći uticaj na polarni rastvarač, nego na nepolarni. Dielektrična konstanta je povezana sa dipolnim momentom, i generalno oslikava polarnost molekula, što je takođe vidljivo u većoj vrednosti frakcionog parametra, *fp*. Pokazano je da je bolji pokazatelj za pogodnost rastvarača za proces elektrospredanja od dipolnog momenta ili nekih drugih osobina rastvarača (tačka ključanja, gustina) [Wannatong i sar., 2004]. Smatra se da rastvarač sa većom dielektričnom konstantom ima veću gustinu naelektrisanja u rastvoru. Kako se naelektrisanje prenošeno mlazom povećava tokom elektrospredanja, javljaju se veće sile istezanja u oblasti električnog, što rezultuje manjim proširenjima i nanovlaknima manjih dijametara [Son i sar., 2004]. Posmatranjem pod optičkim mikroskopom, za rastvor sa dielektričnom konstantom rastvarača približno 19 (smeša acetona i hloroforma (90:10 m/m), uočena su vlakna, dok su se kod aceton-Soluplus<sup>®</sup> vlakana (dielektrična konstanta 20,6) mogla uočiti proširenja na vlaknima. Najverovatniji uzrok za ova proširenja na vlaknima jeste niska tačka isparavanja acetona, što je dovelo do povremenog začepljenja igle, i do nestabilnosti procesa [Augustine i sar., 2016; Jaeger i sar., 1998]. Aceton je zbog toga posmatran kao manje pogodan rastvarač u odnosu na smešu sa hloroformom (90:10 m/m), upravo zbog veće nestabilnosti samog procesa, bez obzira što bi veća dielektrična konstanta mogla dovesti do dobijanja vlakana manjih dijametara, njegove druge osobine su smanjile njegovu primenljivost u ovom slučaju. Na osnovu ovih rezultata u preliminarnoj fazi elektrospredanja, smeša acetona i hloroforma (90:10 m/m) je procenjena kao optimalna u odnosu na stabilnost procesa elektrospredanja i izgleda vlakana, tj. prisustva nepravilnosti i proširenja na dobijenim vlaknima. Kombinacija ova dva rastvarača izmenila je osobine konačnog rastvarača, čime su prevaziđeni njihovi pojedinačni nedostaci i omogućen je stabilan proces elektrospredanja. Ovaj kombinovani pristup formiranja regiona rastvorljivosti Soluplus<sup>®</sup>-a, i u sledećem koraku razmatranja dodatnih karakteristika rastvarača (dielektrična konstanta, mogućnost rastvaranja

karvedilola), omogućio je razvoj binarnog sistema rastvarača za dobijanje nanovlakana elektropredenjem. Dobijeni region rastvorljivosti za Soluplus® na ternarnom dijagramu može olakšati izbor rastvarača za proces elektropredenja, ukoliko se uzme neka druga lekovita supstanca u razmatranje.

#### 4.2.3 Karakterizacija nanovlakana

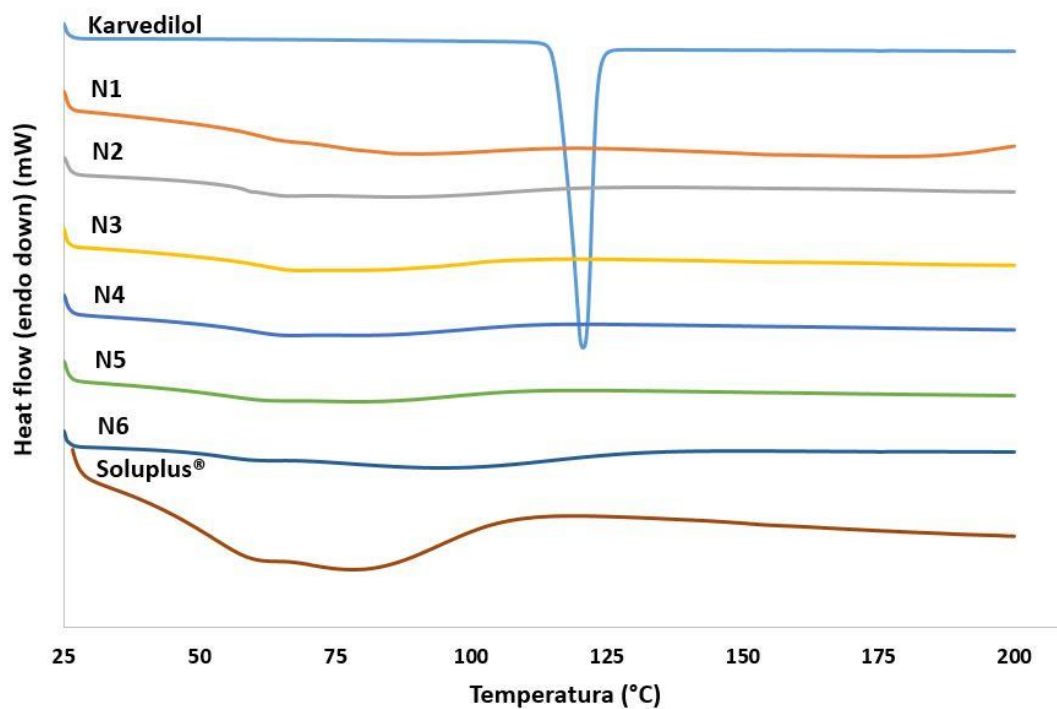
Nakon procesa selekcije odgovarajućeg rastvarača, pristupljeno je procesu elektropredenja. Tokom celokupnog procesa, *Taylor*-ova kupa je bila stabilna, tako da je i sveukupni proces bio stabilan. U literaturi je objašnjeno i pokazano da veliki broj faktora može uticati na morfologiju nanovlakana, ali da sam proces elektropredenja nema uticaja na integritet lekovite supstance, što je potvrđeno različitim metodama (Ramakrishna i sar., 2005; Sridhar i sar., 2011; Verreck i sar., 2003; Nagy i sar., 2012; Rošic i sar., 2012). U toku procesa elektropredenja pokazano je da rastvori sa maksimalno 50% karvedilola (računato na suhu masu Soluplus®-a) mogu biti elektropredeni uz korišćenu smešu rastvarača. Potrč i saradnici su pokazali inkorporiranje 60% karvedilola uz korišćenje smeše acetona i hloroforma u drugačijem odnosu (75:25), pri čemu je kao polimer korišćen polikaprolakton [Potrč i sar., 2015]. Što se tiče karakterizacije dobijenih vlakana, najpre je sprovedena skenirajuća elektronska mikroskopija. Kao što se može videti na slici 15, površinska morfologija vlakana je bila glatka, ali je trend pojavljivanja proširenja na vlaknima bio uočljiviji na formulacijama sa manjim udelom karvedilola (N1 i N2) u odnosu na N3-N6. Čista vlakna Soluplus®-a su lako proizvedena i bila su bez proširenja. Dobijena vlakna su imala regularan, cilindričan oblik. Prosečan dijametar nanovlakna je bio manji od 1 μm za sve formulacije (N1-N6). Stabilna *Taylor*-ova kupa i stabilan proces elektropredenja, pokazali su da je ova kombinacija rastvarača i polimera Soluplus®-a, pogodna za svrhu dobijanja nanovlakana kao nosača za karvedilol.



Slika 15. Mikrografije karvedilol-Soluplus<sup>®</sup> nanovlakana sa različitim udelima karvedilola (A-F) (tabela 7): A) N1; B) N2; C) N3; D) N4; E) N5 i F) N6.

DSC analiza dobijenih nanovlakana sprovedena je i reprezentivni termogrami su prikazani na slici 16 (maksimalno 50% karvedilola inkorporirano). DSC analiza je sprovedena u cilju

procene fizičkog stanja karvedilola u čvrstim disperzijama sa Soluplus<sup>®</sup> polimerom, dobijenim elektropredenjem. Izolovani pik za kristalnu formu karvedilola nije uočen ni na jednom od termograma ovih uzoraka, što može ukazivati na to da je karvedilol bio prisutan u amorfnoj formi ili je bio rastvoren u Soluplus<sup>®</sup>-u, kao što je bilo predviđeno procenom stepena mešanja karvedilola i Soluplus<sup>®</sup>-a u prvoj fazi eksperimentalnog istraživanja. Kao što je prikazano na slici 16, čist karvedilol karakteriše jedan, oštar endotermni pik topljenja na 119,12 °C; što odgovara tački topljenja karvedilola, time potvrđujući njegovu kristalnu formu. Jedan od aspekata koji je potrebno razmotriti jeste činjenica da Soluplus<sup>®</sup> ima nižu tačku topljenja od karvedilola, pri čemu postoji mogućnost da se karvedilol rastvori u polimeru, i izostanak pika karvedilola na termogramima nanovlakana može ukazati na kristalni oblik karvedilola. Međutim, pregledom SEM mikrografija nije uočeno postojanje kristala na samoj površini vlakana, kojih bi bilo da je karvedilol u obliku kristala. Ova pojava je opisana u literaturi i lako uočljiva na SEM mikrografijama [Potrč i sar., 2015].

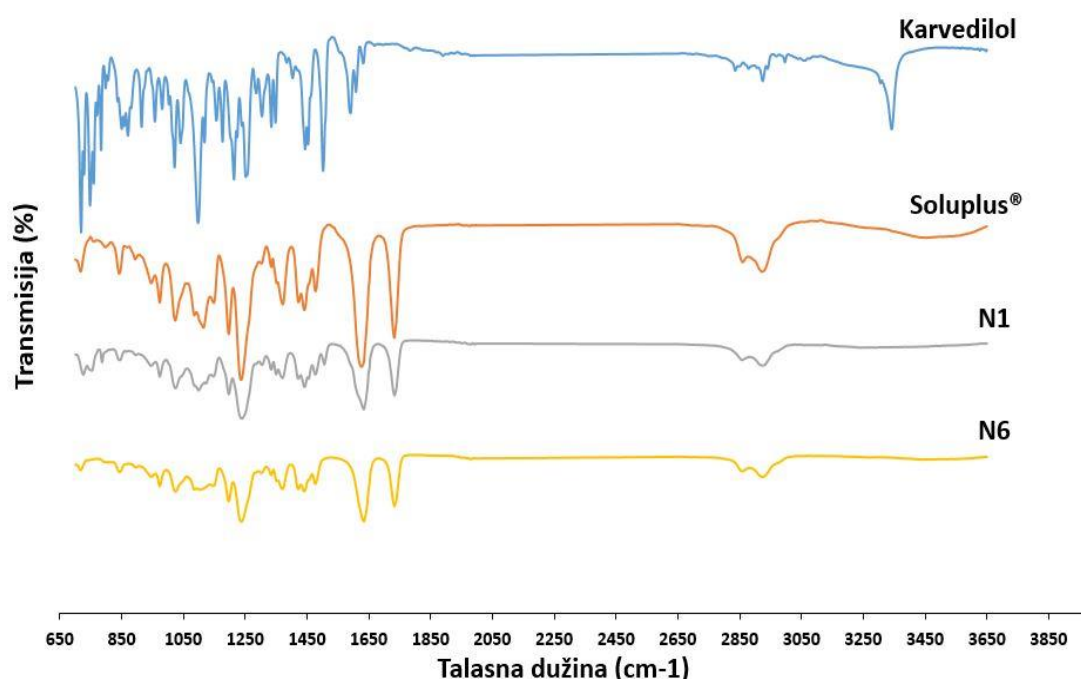


Slika 16. Termogrami čistog karvedilola, Soluplus<sup>®</sup>-a i nanovlakana sa različitim udelima karvedilola dobijeni diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom

Na osnovu DSC analize za sve formulacije N1-N6 (tabela 7), može se reći da su nanovlakna Soluplus<sup>®</sup>-a impregnirana karvedilolom, najverovatnije sadržala karvedilol u nekristalnom

obliku, preciznije u amorfnoj formi. Nije bilo moguće inkorporirati veći udeo karvedilola u ova vlakna Soluplus<sup>®</sup>-a elektroprednjem, dok u literaturi postoje podaci i sa većim udelom inkorporiranog karvedilola u nanovlakna [Potrč i sar., 2015].

Takođe, izvršena je karakterizacija uzoraka korišćenjem IR spektroskopije sa Furijeovom transformacijom, u cilju proučavanja potencijalnih interakcija između karvedilola i Soluplus<sup>®</sup>-a u izrađenim karvedilol-Soluplus<sup>®</sup> nanovlaknima. Analizom karakterističnih pikova karvedilola, može se utvrditi njegovo fizičko stanje. Formulacije sa najnižim (N1, 5%) i najvišim (N6, 50%) udelom karvedilola su predstavljene na slici 17, kao i Soluplus<sup>®</sup> i karvedilol.

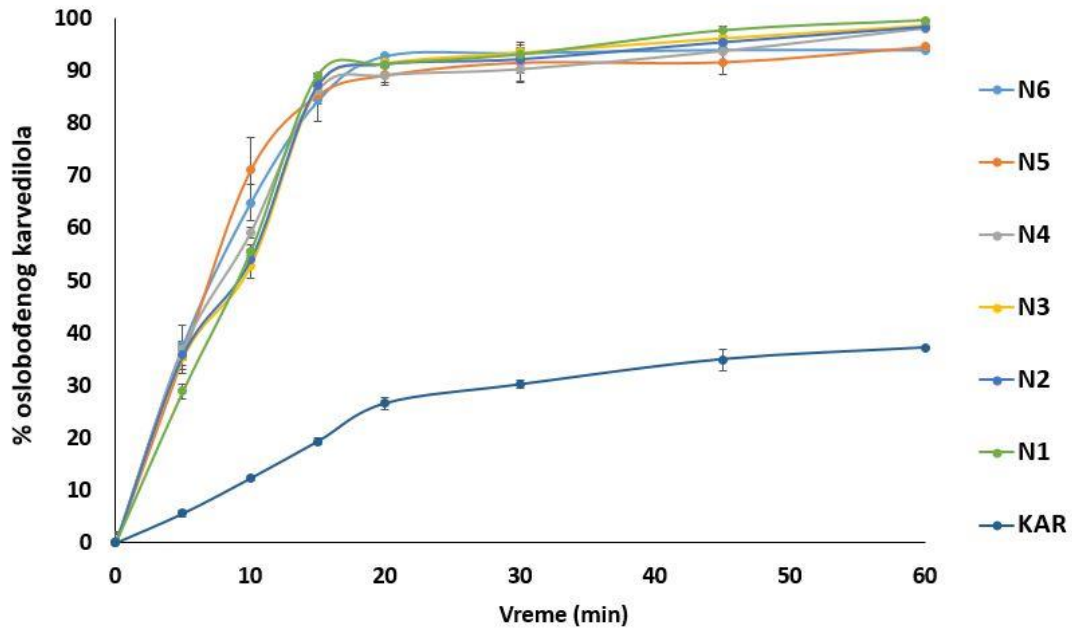


Slika 17. FTIR spektri za čist karvedilol, Soluplus<sup>®</sup> i formulacije nanovlakana sa najmanjim i najvećim udelom karvedilola (N1 i N6)

Na FTIR spektru čistog karvedilola vidi se intenzivna, dobro definisana, karakteristična infracrvena apsorpciona traka na 3344,5 cm<sup>-1</sup>, koja odgovara N-H vibracijama koje potiču od sekundarnog amina. Tri intenzivne apsorpcione trake na 2993,87 cm<sup>-1</sup> i 2924,5 cm<sup>-1</sup>, i na 1099 cm<sup>-1</sup>, koje odgovaraju C-H alifatičnom istezanju i C-O istezanju, respektivno. Takođe, prisutne su druge oštre trake od 1500 do 1400 cm<sup>-1</sup>, kao C-C aromatično istezanje, i 1253 cm<sup>-1</sup> kao C-N istezanje. Soluplus<sup>®</sup> je pokazao pikove na 3488,72 cm<sup>-1</sup> kao O-H istezanje, 2927,98 cm<sup>-1</sup> kao aromatično C-H istezanje, 1735,93 i 1635,23 cm<sup>-1</sup>, kao C-O istezanje i 1477 cm<sup>-1</sup> kao C-O-C istezanje. FTIR spektar karvedilol-Soluplus<sup>®</sup> nanovlakana u obliku čvrstih disperzija nije pokazao karakteristični pik karvedilola na 3344,5 cm<sup>-1</sup> koji odgovara N-H istezanju. Ovo može

biti protumačeno kao moguća interakcija između –NH grupe karvedilola i –CO grupe Soluplus<sup>®</sup>-a, što bi vodilo do formiranja amidne grupe u nanovlaknima, što je opisano u literaturi [Shamma and Basha, 2013].

Na osnovu rezultata ispitivanja *in vitro* brzine rastvaranja karvedilola, pokazano je da je formulacija nanovlakana sa Soluplus<sup>®</sup>-om (N1-N6) dovela do poboljšanja brzine rastvaranja karvedilola u odnosu na brzinu rastvaranja čistog karvedilola (slika 18). Sadržaj karvedilola u nanovlaknima (N1-N6) je bio između 84 do 93%. Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja pokazuju da se iz svih 6 formulacija oslobodilo više od 85% karvedilola u prvih 15 minuta ispitivanja, i više od 95% na kraju jednočasovnog ispitivanja brzine rastvaranja. Potrč i saradnici su u svom istraživanju koristeći polikaprolakton dobili manji procenat oslobođenog karvedilola iz vlakana. Rezultati su pokazali do 80% oslobođenog karvedilola u nanovlaknima koja su sadržala do 40% karvedilola, dok je za nanovlakna sa 50 i 60% karvedilola, oslobođeno između 49 i 56% za 120 minuta, što se tumači različitim odnosom molekulske mase karvedilola i samog polimera [Potrč i sar., 2015]. Ispitivanje brzine rastvaranja čistog karvedilola, pokazalo je da se manje od 40% karvedilola rastvorilo u toku 1 časa, što pokazuje da su karvedilol-Soluplus<sup>®</sup> nanovlakna poboljšala brzinu rastvaranja čiste kristalne supstance, karvedilola. Ispitivanjem brzine rastvaranja karvedilola iz dobijenih nanovlakana sa Soluplus<sup>®</sup>-om, pokazano je da se visok procenat karvedilola iz nanovlakana oslobodio, tj. rastvorio, što se pretpostavlja da je posledica mehanizma kojim čvrste disperzije utiču na rastvorljivost, tj. brzinu rastvaranja teško rastvornih lekovitih supstanci, ali i dostupnosti lekovite supstance medijumu u formiranim vlaknima. Na osnovu profila brzine rastvaranja (slika 18), najveće razlike u brzini rastvaranja između ovih formulacija su bile u prvih 15 minuta testiranja. Nakon 15 minuta, nastavak oslobađanja karvedilola je bio sličan kod svih formulacija, u opsegu od 5 do 50% karvedilola.



Slika 18. Profili brzine rastvaranja karvedilola iz formulacija N1-N6, i čistog karvedilola

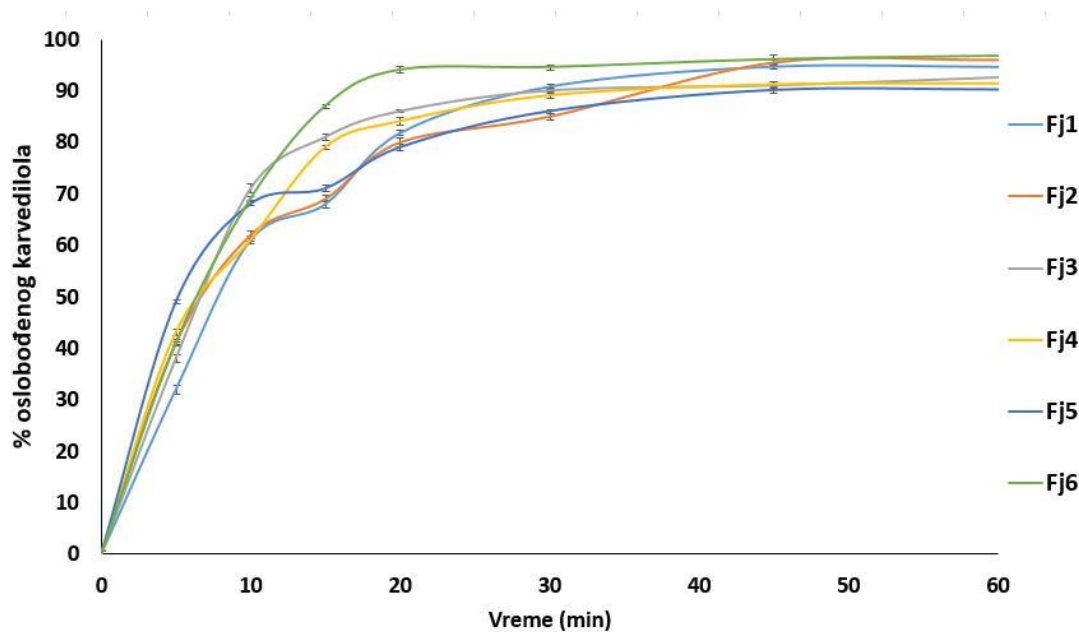
Ovi podaci pokazuju da kada uzorci čvrstih disperzija sadrže do 50% karvedilola, trenutno oslobađanje karvedilola se može dogoditi, i da je brzina rastvaranja karvedilola u ovom opsegu koncentracija poboljšana u odnosu na kristalnu supstancu karvedilol.



### 4.3 Formulacija tabletnih jezgara

Nakon završene prve i druge faze eksperimentalnog istraživanja, gde su rezultati pokazali da se formiranjem čvrstih disperzija karvedilola i Soluplus<sup>®</sup>-a može postići povećanje brzine rastvaranja karvedilola upravo zahvaljujući mešanju ove dve komponente na molekulskom nivou, odnosno formiranjem čvrstih disperzija, bilo je potrebno razmotriti mogućnost formulacija tabletnih jezgara sa trenutnim oslobađanjem karvedilola kroz dva različita pristupa. Prvi pristup podrazumevao je formulaciju tableta korišćenjem konvencionalnih pomoćnih supstanci (superdezintegratori, osmotski aktivne supstance), dok je drugi podrazumevao kompresiju karvedilol-Soluplus<sup>®</sup> nanovlakana (50% karvedilola u odnosu na suhu masu vlakna) u tabletna jezgra. Ova faza istraživanja vršena je u cilju procene uticaja formulacionih parametara tabletnog jezgra na jedan od CQAs, tj. na količinu oslobođenog karvedilola iz jezgra. Imajući u vidu da formulacija samog tabletnog jezgra može imati značajniji uticaj na *lag time* i količinu oslobođenog karvedilola iz obloženih tableta nego na količinu oslobođenog karvedilola iz samog jezgra, rezultate ove faze je potrebno detaljnije prokomentarisani u sklopu rezultata koji se tiču obloženih tableta.

Za formulisanje tabletnih jezgara korišćeni su krosppovidon i natrijum-skrobglikolat iz grupe superdezintegratora, i manitol i natrijum-hlorid iz grupe osmotski aktivnih supstanci, kao i Ludipress<sup>®</sup>, koji predstavlja koprosesovani ekscipijens dobijen kao kombinacija laktoze, povidona i krosppovidona. U tabeli 10 prikazane su formulacije tabletnih jezgara (Fj1-Fj6). Izvršeno je ispitivanje brzine rastvaranja karvedilola iz ovih formulacija i profili brzine rastvaranja karvedilola prikazani su na slici 19.



Slika 19. Brzina rastvaranja karvedilola iz tabletnih jezgara Fj1-Fj5, i iz tabletnog jezgra dobijenog kompresijom nanovlakana Fj6

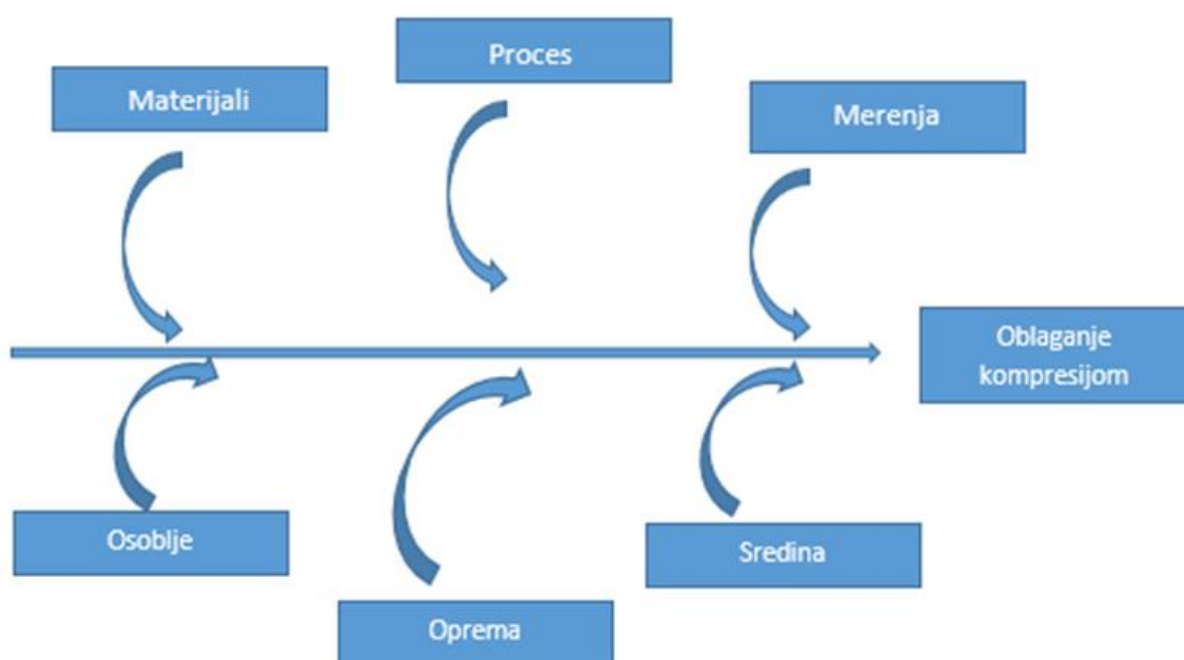
Na slici 19. prikazani su profili brzine rastvaranja karvedilola iz navedenih formulacija tabletnih jezgara. Kao što se može videti, razlika u formulacijama se vidi jedino kod Fj6, posmatrajući prvih 15 minuta ispitivanja, gde je već do 15-og minuta oslobođeno više od 85% karvedilola, što odgovara pojmu veoma brzog rastvaranja (engl. *very rapid dissolution*) dok kod drugih formulacija to nije bio slučaj [FDA, 2017]. Što se tiče ukupne količine oslobođenog karvedilola, može se reći da značajne razlike nije bilo u profilima ovih formulacija. Brže oslobađanje karvedilola u slučaju formulacije Fj6, verovatno je posledica formiranja čvrste disperzije karvedilola i Soluplus<sup>®</sup>-a u toku procesa elektropredenja. Zahtev za trenutno oslobađanje lekovite supstance (> 85% u toku 30 minuta) zadovoljen je za svih 6 formulacija tabletnih jezgara. Potencijalni problemi su uočeni prilikom tabletiranja nanovlakana. Budući da su dobijena nanovlakna, zapravo depoziti na aluminijumskoj foliji, bilo ih je potrebno usitniti, a potom uz dodatak odgovarajućeg punioca i tabletirati. Sam problem nastaje pri pripremi smeše za tabletiranje i samom tabletiranju zbog naelektrisanja koje se javlja prilikom manipulacije sa ovim vlaanima. Proces punjenja matrice na tablet mašini, koji je bio manuelan zbog male količine uzorka, bio je veoma zahtevan.

## 4.4 Izrada i karakterizacija tableta obloženih kompresijom

U ovoj fazi izvršen je razvoj formulacije tabletnog omotača za tablete obložene kompresijom, korišćenjem eksperimentalnog dizajna, uz inicijalnu procenu rizika kao i uz upotrebu alata FMEA za detaljnu analizu rizika.

### 4.4.1 Inicijalna procena rizika

Što se tiče preliminarne procene rizika, neophodno je navesti sve faktore koji mogu uticati na kvalitet proizvoda i grupisati ih u određene kategorije. Preliminarna (inicijalna) analiza rizika se vrši na osnovu literaturnih podataka, prethodnih eksperimentalnih rezultata i iskustva. U ovoj fazi, identifikovani rizici predstavljeni su u formi odgovarajućeg dijagrama. U slučaju procesa oblaganja kompresijom, moguće je izdvojiti nekoliko kategorija faktora sa potencijalnim uticajem na kvalitet proizvoda, tj. na proces oblaganja kompresijom, a time i na ciljni profil kvaliteta proizvoda (slika 20).

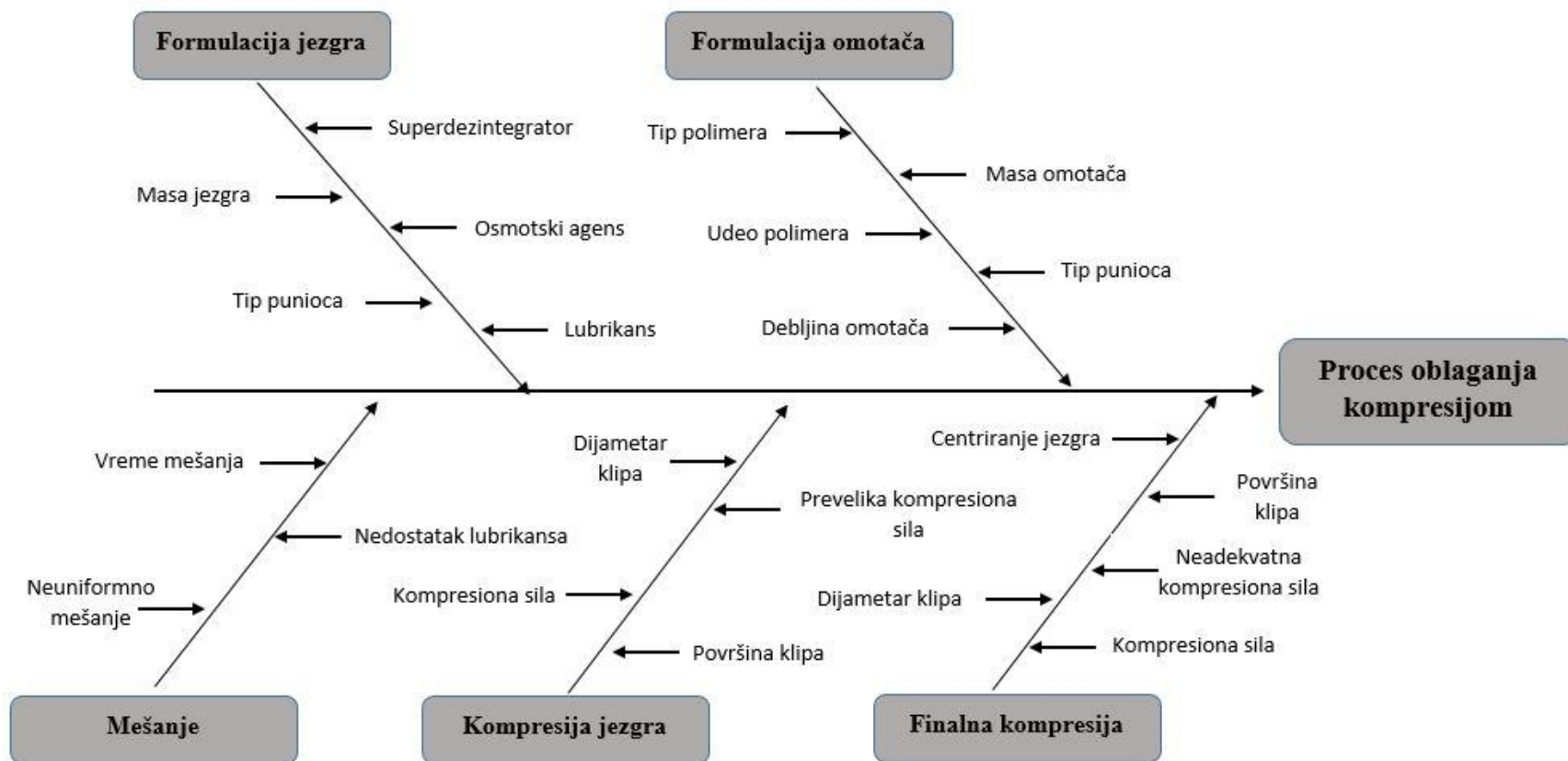


Slika 20. Grupe faktora koje utiču na proces oblaganja kompresijom

Na slici 21, *fish bone* dijagramom predstavljeni su formulacioni i procesni parametri koji mogu uticati na proces oblaganja kompresijom. Faktori iz kategorije *Osoblje*, *Sredina* i *Oprema* su izostavljeni na osnovu pretpostavke da njihov uticaj na QTPP tableta karvedilola obloženih

kompresijom može biti kontrolisan, na osnovu preliminarno sprovedenih eksperimenata. Detaljnije su prikazani faktori koji se tiču kompresije jezgra, kao i samog oblaganja (kompresione sile), kao i faktori koji potiču od formulacije, jezgra i omotača. Tokom inicijalne procene rizika, pored hijerarhijskog organizovanja faktora u vidu *fish bone* dijagrama, faktori sa potencijalnim uticajem na karakteristike kvaliteta završnog proizvoda, podeljeni su u kategorije koje su kvalitativno opisane (*nizak, srednji i visok rizik*) sa ciljem jasnijeg uvida u stepen njihovog uticaja.

U tabeli 23 u prvoj koloni su predstavljene neki od atributa kvaliteta tableta obloženih kompresijom, dok su u ostalim kolonama navedeni potencijalni formulacioni i procesni faktori koji mogu uticati na njih. Polja u tabeli koja su bele boje govore da taj faktor najverovatnije ima nizak rizik za određeni atribut kvaliteta, siva boja govori da postoji srednji rizik, dok polja crne boje ukazuju na to da postoji velika verovatnoća da taj faktor utiče na kvalitet konačnog proizvoda. U konkretnom slučaju, može se videti da formulacija omotača tableta, kao i završna kompresija predstavlja visok rizik za parametre kao što su *lag time* i % oslobođenog leka, dok se formulacija tabletnog jezgra i kompresija jezgra imaju visok rizik samo za % oslobođenog leka, dok predstavljaju srednji rizik za *lag time* kao karakteristiku obloženih tableta. Lubrikacija i mešanje spadaju u grupu faktora sa niskim rizikom za *lag time*, dok lubrikacija ima srednji rizik za % oslobođenog leka, a sama faza mešanja predstavlja srednji rizik kada se posmatra ujednačenost sadržaja, dok svi ostali faktori ne utiču značajno na ovaj atribut kvaliteta. Vidi se i da centriranje jezgra kao faza predstavlja nizak rizik za % oslobođenog leka iz tableta obloženih kompresijom (tabela 20).



Slika 21. Procesni i formulacioni parametri koji mogu imati uticaj na proces oblaganja kompresijom

Tabela 20. Potencijalni faktori rizika koji mogu uticati na kvalitet tableta obloženih kompresijom

CQAs	Formulacija jezgra	Formulacija omotača	Mešanje	Lubrikacija	Kompresija jezgra	Centriranje jezgra	Završna kompresija
<i>Lag time</i>							
% olobođene lekovite supstance							
ujednačenost sadržaja lekovite supstance							
<b>Legenda</b>							
	Nizak rizik						
	Srednji rizik						
	Visok rizik						

#### **4.4.2 FMEA analiza i ispitivanja tableta obloženih kompresijom**

Na osnovu inicijalne procene rizika, preliminarnih eksperimenata i na osnovu prethodno stečenog iskustva, sprovedena je FMEA analiza. Najpre je definisan QTPP (tabela 9). U analizu su bili uključeni procesni i formulacioni parametri. Korišćen je RXpress software za sprovođenje FMEA (Educe Global Inc., USA). Definisani su atributi materijala i procesni parametri za proces oblaganja kompresijom, kao i kritični atributi kvaliteta tableta obloženih kompresijom (tabele 13 i 14) i izvršeno je njihovo mapiranje, tj. povezivanje (tabela 21). Ovaj postupak podrazumeva povezivanje svakog kritičnog atributa kvaliteta sa određenim atributima materijala i procesnim parametrima. Proces mapiranja za navedene CQAs naveden je u tabeli 21. Nakon toga je za svako definisano neizvršenje definisana verovatnoća, ozbiljnost i mogućnost detekcije (tabela 12).

Tabela 21. Mapiranje CQAs tableta obloženih kompresijom

<b>Kritični atributi kvaliteta (CQAs)</b>	<b>Atributi materijala</b>	<b>Procesni parametri</b>
<b><i>q</i></b>	Koncentracija natrijum-skrobglikolata (SSG) Koncentracija kros повідona (CP) Koncentracija manitola Koncentracija natrijum-hlorida (NaCl) Tip punioca	Sila kompresije jezgra
<b><i>Lag time</i></b>	Koncentracija natrijum-skrobglikolata (SSG) Koncentracija kros повідona (CP) Koncentracija manitola Koncentracija natrijum-hlorida (NaCl) Tip punioca Molekulska masa polimera Koncentracija Polyox WSR N60K	Sila kompresije jezgra Centriranje jezgra Sila kompresije za oblaganje tableta
<b><i>Q</i></b>	Koncentracija natrijum-skrobglikolata (SSG) Koncentracija kros повідona (CP) Koncentracija manitola Koncentracija natrijum-hlorida (NaCl) Tip punioca Molekulska masa polimera Koncentracija Polyox WSR N60K	Sila kompresije jezgra Centriranje jezgra Sila kompresije za oblaganje tableta

U tabeli 22, sumirani su svi potencijalni uzroci za svako od neizvršenja, za svaku CQAs. Ukoliko se posmatra neizvršenje vezano za na primer *lag time*, onda ono podrazumeva izostanak, kratko ili predugo *lag time*, pri čemu su neki od potencijalnih faktora i njihovi glavni uzroci niska ili visoka koncentracija polimera, zatim previsoka ili preniska završna sila kompresije (tabela 22).



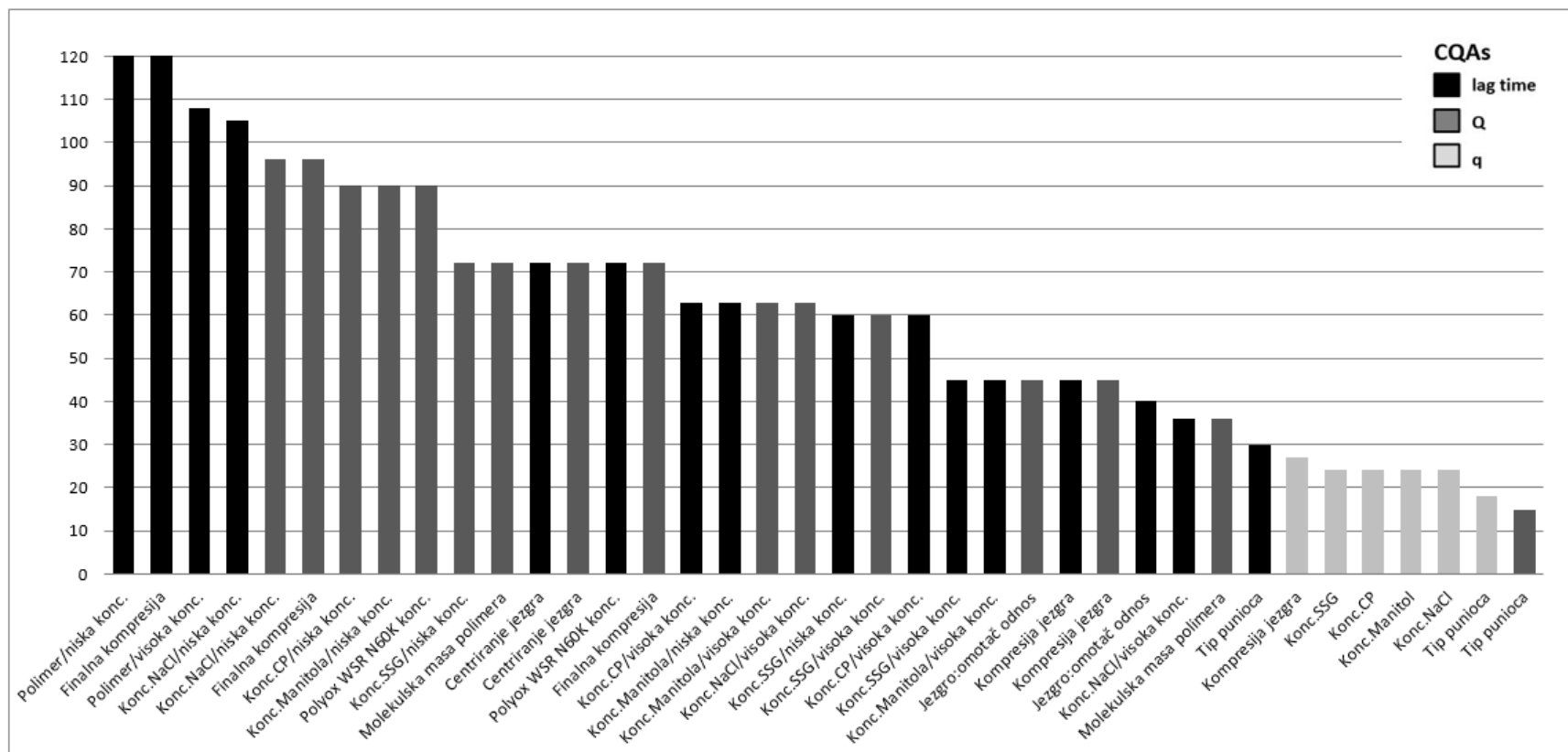
Tabela 22. Potencijalni uzroci za odstupanja

Potencijalna faktori neizvršenja/odstupanja	CQAs	Uzrok neizvršenja
Koncentracija polimera	Lag time	Niska ili visoka koncentracija polimera
Molekulska masa polimera	Lag time	Niska ili visoka molekulska masa polimera
Koncentracija Polyox WSR N60K	Lag time	Niska ili visoka koncentracija Polyox WSR N60K
Kompresija jezgra	Lag time	Visoka sila kompresije
Jezgro-omotač odnos	Lag time	Neadekvatan odnos
Finalna kompresija	Lag time	Niska ili visoka sila kompresije
Centriranje jezgra	Lag time	Necentrirano jezgro
Koncentracija natrijum-skrobglikolata	Lag time	Niska/visoka koncentracija natrijum-skrobglikolata; jezgro „zarobljeno“ u omotaču
Koncentracija krosprovidona	Lag time	Niska/visoka koncentracija krosprovidona; jezgro „zarobljeno“ u omotaču
Koncentracija natrijum-hlorida	Lag time	Niska/visoka koncentracija natrijum-hlorida; jezgro „zarobljeno“ u omotaču
Koncentracija manitola	Lag time	Niska/visoka koncentracija manitola; jezgro „zarobljeno“ u omotaču
Tip punioca	Lag time	Rastvorljivost
Koncentracija natrijum-skrobglikolata	Q	Niska/visoka koncentracija natrijum-skrobglikolata; jezgro „zarobljeno“ u omotaču
Koncentracija krosprovidona	Q	Niska/visoka koncentracija krosprovidona; jezgro „zarobljeno“ u omotaču
Koncentracija natrijum-hlorida	Q	Niska/visoka koncentracija natrijum-hlorida; jezgro „zarobljeno“ u omotaču
Koncentracija manitola	Q	Niska/visoka koncentracija manitola; jezgro „zarobljeno“ u omotaču
Finalna kompresija	Q	Niska/visoka sila kompresije
Molekulska masa polimera	Q	Niska/visoka molekulska masa polimera
Koncentracija Polyox WSR N60K	Q	Niska/visoka koncentracija Polyox WSR N60K
Kompresija jezgra	Q	Visoka sila kompresije
Jezgro-omotač odnos	Q	Nizak ili visok odnos
Centriranje jezgra	Q	Necentrirano jezgro
Kompresija jezgra	q	Visoka sila kompresije
Koncentracija natrijum-skrobglikolata	q	Neadekvatna koncentracija
Koncentracija krosprovidona	q	Neadekvatna koncentracija
Koncentracija manitola	q	Neadekvatna koncentracija
Koncentracija natrijum-hlorida	q	Neadekvatna koncentracija
Tip punioca	q	Rastvorljivost

Na osnovu preliminarnih eksperimenata i detaljnog pregledanja literature, za svaki od potencijalnih uzroka je izabrana kategorija za značajnost, verovatnoćnoću pojavljivanja i mogućnost detekcije samih neizvršenja. Potom je u softveru izvršeno povezivanje dodeljenih skorova za izabrane kategorije za svako neizvršenje i izračunavanje RPN vrednosti. Ukoliko su RPN vrednosti za jedno neizvršenje različitih uzroka, bile jednake, u konačnoj tabeli, prikazani su kao jedna vrednost. Sve dobijene vrednosti RPN, poredane su po opadajućoj vrednosti i prikazane u tabeli 23 i na slici 22.

Tabela 23. Potencijalna neizvršenja i njihove RPN vrednosti

Potencijalna neizvršenja	RPN	Potencijalna neizvršenja	RPN
Niska koncentracija polimera	120	Niska koncentracija SSG	60
Finalna kompresija	120	Visoka koncentracija SSG	60
Visoka koncentracija polimera	108	Visoka koncentracija CP	60
Niska koncentracija NaCl	105	Visoka koncentracija SSG	45
Niska koncentracija NaCl	96	Visoka koncentracija manitola	45
Finalna kompresija	96	Jezgro:omotač odnos	45
Niska koncentracija CP	90	Kompresija jezgra	45
Niska koncentracija manitola	90	Kompresija jezgra	45
Polyox WSR N60K koncentracija	90	Jezgro:omotač odnos	40
Niska koncentracija SSG	72	Visoka koncentracija NaCl	36
Molekulska masa polimera	72	Molekulska masa polimera	36
Centriranje jezgra	72	Tip punioca	30
Centriranje jezgra	72	Kompresija jezgra	27
Polyox WSR N60K koncentracija	72	Koncentracija SSG	24
Finalna kompresija	72	Koncentracija CP	24
Visoka koncentracija CP	63	Koncentracija manitola	24
Niska koncentracija manitola	63	Koncentracija NaCl	24
Visoka koncentracija manitola	63	Tip punioca	18
Visoka koncentracija NaCl	63	Tip punioca	15

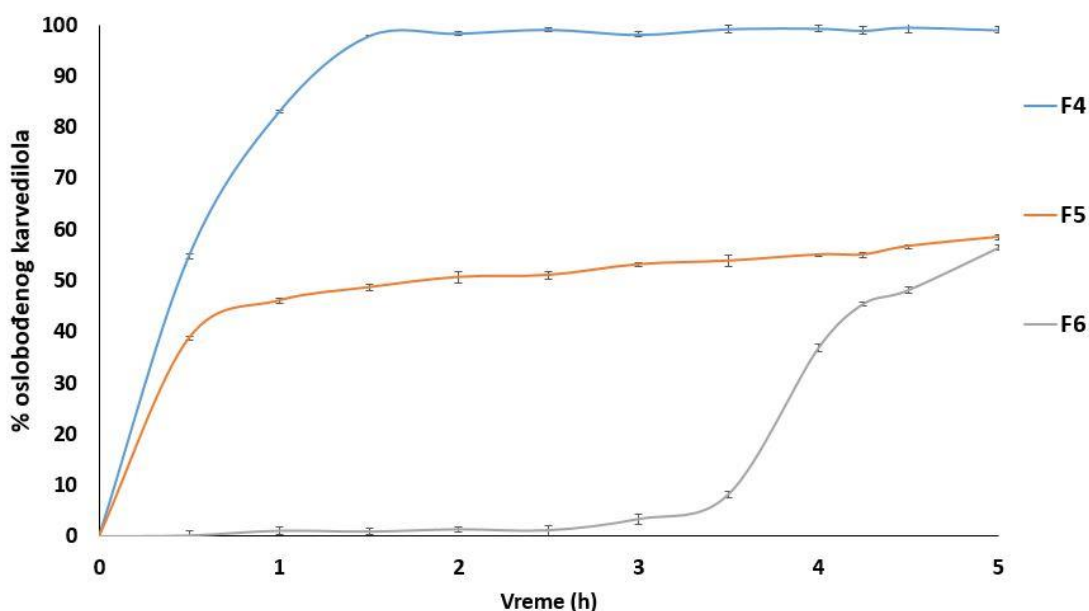


Slika 22. Izračunate vrednosti RPN za svako potencijalno neizvršenje u FMEA tableta obloženih kompresijom, za definisane CQAs *lag time*, **q** (količina oslobođenog karvedilola iz tabletnog jezgra), **Q** (količina oslobođenog karvedilola iz obloženih tableta)

Tri različita CQAs (*lag time*, količina oslobođenog karvedilola iz tabletnog jezgra - **q**, i količina oslobođenog karvedilola iz obloženih tableta - **Q**) praćena su tokom analize rizika, tako da je procenjen uticaj svakog parametra na svaki od praćenih kritičnih atributa kvaliteta obloženih tableta i predstavljen je različitom bojom na slici 22. Crnom bojom prikazan je uticaj na *lag time*, i na slici 22 se može videti da su upravo najviše RPN vrednosti (RPN > 100) faktori koji utiču na ovaj CQA, kao što su niska ili visoka koncentracija polimera, ili finalna kompresija, dok od svih ostalih parametara, najniži RPN, tj. najmanji uticaj na *lag time* ima tip punioca (RPN=30). Kada se posmatraju RPN vrednosti faktora koje utiču na količinu oslobođenog karvedilola iz obloženih tableta, odnosno na **Q**, može se videti da je tu izražen uticaj pomoćnih supstanci natrijum-hlorida, krospovidona, natrijum-skrobglikolata, manitola, ali i molekulska masa polimera i finalna kompresija (RPN>70). Ove vrednosti ukazuju na to da su za oslobađanje lekovite supstance iz tableta obloženih kompresijom, tj. za količinu oslobođene supstance, odgovorni kako parametri vezani za tabletno jezgro, tako i za tabletni omotač, i da su ovi parametri iz grupe i formulacionih i procesnih (proces kompresije) parametara. Kada se posmatra uticaj faktora na količinu oslobođenog karvedilola iz tabletnih jezgara, može se videti da su njihove RPN vrednosti najniže među ispitivanim, i sličnog reda veličina međusobno (RPN<30). Nakon sprovođenja FMEA analize, u cilju procene ovih rezultata, procenjen je i eksperimentalno uticaj formulacionih parametara tableta obloženih kompresijom na brzinu rastvaranja karvedilola. U prvoj fazi, izvršena je formulacija tabletnih jezgara (tabela 10), a potom je pristupljeno formulaciji tabletnog omotača koji će omogućiti odloženo oslobađanje karvedilola. Na osnovu izračunatih RPN vrednosti, i uvida u uticaj faktora koji se tiču omotača na CQAs, formulisane su tri formulacije F1, F2 i F3, koje su sadržale Polyox WSR Coagulant, Polyox WSR 301 i Polyox WSR N60K (tabela 12) i izvršeno je ispitivanje brzine rastvaranja karvedilola iz njih. Ispitivan je uticaj molekulske mase polimera na CQAs. Ispitivanje brzine rastvaranja karvedilola iz ovih formulacija trajalo je 12h, u toku kojih nije došlo do oslobađanja karvedilola. Rezultati su pokazali da bez obzira na to koju molekulsku masu ima izabrani polimer, upotrebljena količina polimera (80%), vodi ka predugom odlaganju oslobađanja lekovite supstance. Izračunate RPN vrednosti za molekulsku masu polimera su bile 120 za *lag time* i 72 za **Q** kao CQAs. Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja karvedilola su bili u saglasnosti sa

izračunatim visokim RPN vrednostima za faktore koji se tiču koncentracije i molekulske mase polimera u omotaču tableta obloženih kompresijom.

Nakon izostanka oslobađanja karvedilola iz formulacija koje su u omotaču sadržale polimere različite molekulske mase, za dalje ispitivanje izabran je polimer najmanje molekulske mase od ispitivanih Polyox WSR N60K (2000000). Formulacije F4, F5 i F6 sadržale su 10, 20 i 30% polimera u omotaču. Tabletna jezgra ove tri formulacije se nisu razlikovala u odnosu na formulacije F1, F2, i F3 (tabela 12). Rezultati sprovedenih *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja karvedilola su pokazali različite profile za ove formulacije i uticaj koncentracije polimera na *lag time* (slika 23).

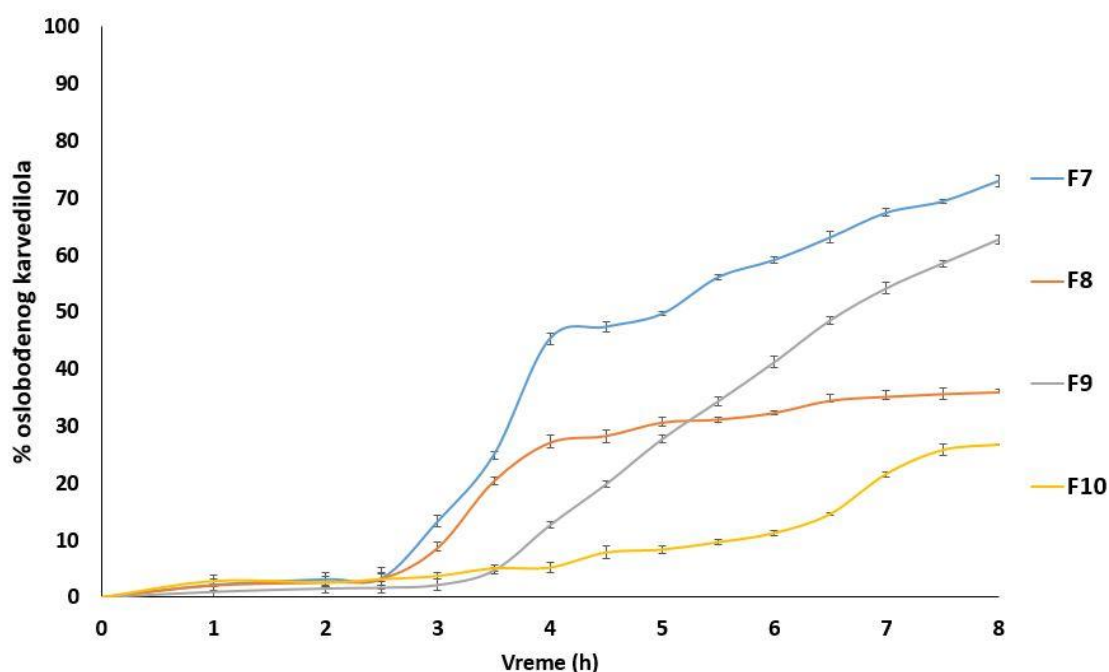


Slika 23. Profili brzine rastvaranja karvedilola iz formulacija F4, F5 i F6

Poređenjem profila brzine rastvaranja karvedilola za ove 3 formulacije, F6 može biti istaknuta kao ona sa najdužim *lag time*, što je poželjno, i upravo zbog toga ovaj polimer je izabran za detaljnije ispitivanje. U FMEA je takođe procenjivan uticaj koncentracije Polyox WSR N60K na CQAs. Dobijena RPN vrednost za uticaj na količinu oslobođenog karvedilola iz obloženih tableta je bila 90, što ukazuje na veliki uticaj ovog parametra, što se vidi i na slici 23 gde je iz formulacije F4, koja je sadržala 10% polimera, oslobođena celokupna količina karvedilola, dok je kod formulacije F6 (30% polimera) oslobođeno manje od 60% karvedilola tokom ispitivanja. Uticaj koncentracije Polyox WSR N60K na

*lag time*, pokazao je da *lag time* ne postoji kod formulacija F4 i F5 (10 i 20% polimera), dok se pri formulaciji F6, vidi *lag time* od približno 3,5 časova. RPN vrednost za uticaj ovog faktora u FMEA je relativno visoka, 72, što ukazuje na značaj uticaja ovog faktora na CQAs, što je eksperimentalno i pokazano. Budući da su rezultati ispitivanja brzine rastvaranja karvedilola iz formulacije F6 pokazali odlaganje oslobađanja karvedilola u toku određenog vremenskog perioda, ali i nepotpunu količinu oslobođenog karvedilola u toku ispitivanja (< 60% od ukupne količine karvedilola), usledila je modifikacija tabletnog jezgra. Treba napomenuti da se tokom ispitivanja brzine rastvaranja karvedilola iz F6 formulacije, moglo uočiti “zarobljeno“ tabletno jezgro u omotaču tablete nakon 5 časova trajanja testa, što se može smatrati razlogom za nekompletno oslobađanje karvedilola.

Na osnovu visokih RPN vrednosti uticaja formulacionih faktora tabletnog jezgra, i potvrde iz prethodne faze da je potrebno izvršiti modifikaciju tabletnog jezgra, pristupljeno je ispitivanju uticaja različitih pomoćnih supstanci koje ulaze u sastav tabletnog jezgra na *lag time* i količinu oslobođenog karvedilola iz obloženih tableta. Za ove potrebe sproveden je eksperimentalni dizajn pomoću koga su, na osnovu eksperimentalnog plana formulisane četiri formulacije F7–F10 (tabela 11). Profili brzine rastvaranja karvedilola iz ovih formulacija prikazani su na slici 24.



Slika 24. Profili brzine rastvaranja karvedilola iz formulacija F7, F8, F9 i F10

U Design Expert programu, prvo je posmatrana *lag time* kao zavisno promenljiva, a potom količina oslobođenog karvedilola iz obloženih tableta – **Q**. Dobijene su matematičke jednačine u kodiranim i realnim vrednostima, prikazane u tabeli 24. A predstavlja nezavisno promenljivu tip dezintegratora, dok B predstavlja koncentraciju Polyox WSR N60K.

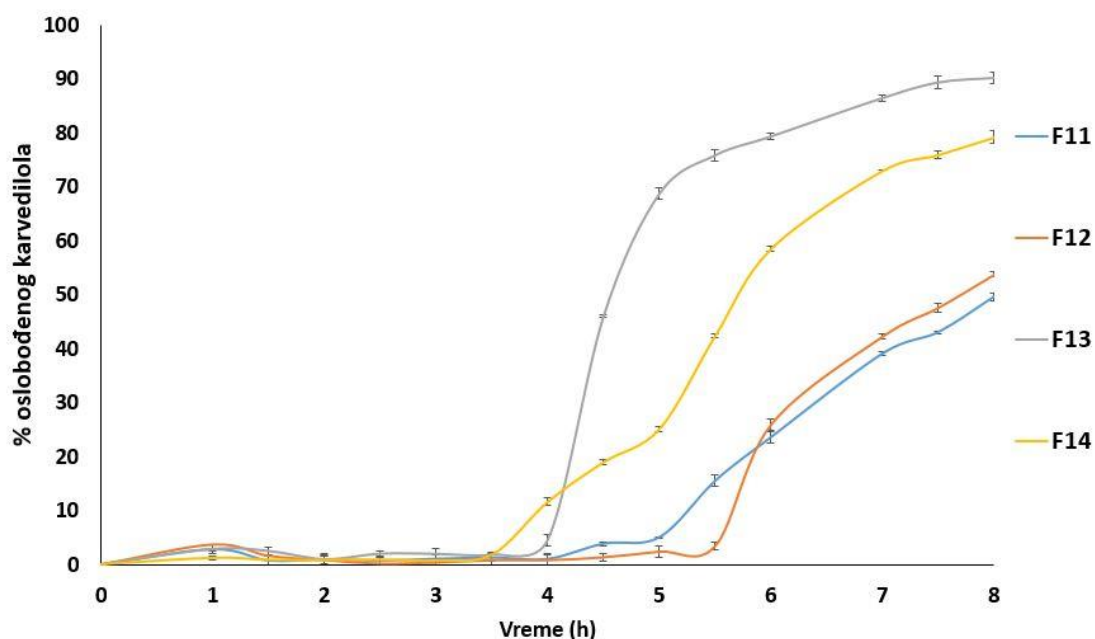
Tabela 24. Matematički modeli dobijeni uklapanjem rezultata 2<sup>2</sup> eksperimentalnog dizajna u model prvog reda za formulacije F7-F10

Zavisno promenljive	<i>lag time</i>	<b>Q</b>
Jednačine u kodiranim vrednostima	$Lag\ time = + 3,13 + 0,6250*B$	$Q = +49,56 - 18,26*A - 4,86*B$
Jednačine u realnim vrednostima	$Lag\ time = - 5,0 + 0,25*Polyox\ N60K$	(za SSG) $Q = + 131,03250 - 1,94500*Polyox\ N60K$
		(za CP) $Q = + 94,5175 - 1,94500*Polyox\ N60K$
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9259	0,9998
<b>p</b>	0,0377	0,0142

Na osnovu ovih jednačina, vidi se uticaj nezavisno promenljivih na zavisno promenljive. Rezultati pokazuju da statistički značajan uticaj na *lag time* ima samo koncentracija Polyox WSR N60K ( $p < 0,05$ ). Uticaj ovog faktora na *lag time* je pozitivan, što se vidi kroz pozitivan predznak uz nezavisno promenljivu u jednačini (+0,6250 za jednačinu u kodiranim vrednostima, odnosno +0,25 za jednačinu u realnim vrednostima). Pozitivan predznak govori da sa promenom koncentracije polimera sa nižeg na viši nivo (sa 30% na 35%) dolazi do povećanja *lag time*. U slučaju **Q**, količine oslobođenog karvedilola, oba faktora imaju statistički značajan uticaj, ali u ovom slučaju negativan, što se ogleda kroz negativan predznak uz nezavisno promenljive A i B. Ovi rezultati govore da sa promenom nivoa nezavisno promenljive A, tj. promenom iz SSG u CP, dolazi do

statistički značajnog smanjenja količine oslobođenog karvedilola. Takođe, promena faktora B, koncentracije Polyox WSR N60K, sa nižeg na viši nivo ima statistički značajan uticaj na količinu oslobođenog karvedilola i dovodi do njegovog smanjenja. RPN vrednosti za koncentraciju Polyox WSR N60K, pokazale su visoku vrednost (72) za *lag time*, a eksperimentalnim dizajnom je potvrđena i statistička značajnost uticaja ovog faktora na praćeni CQA. Takođe, na slici 22 može se videti niža vrednost RPN za koncentraciju SSG i CP (62 i 60, respektivno), što se može dovesti u vezu sa izostankom statistički značajnog uticaja ovog faktora na *lag time*. Negativan uticaj promene superdezintegratora iz SSG na CP, na količinu oslobođenog karvedilola, može se primetiti i u RPN vrednostima, gde je za SSG vrednost pokazan manji rizik za uticaj na Q, kroz nižu RPN vrednost (72) u odnosu na CP (90). Reddy i sar. [2014] su takođe pokazali da je u formulaciji jezgra, tableta obloženih kompresijom, SSG vodio do veće količine oslobođenog lekarnidipin-hidrohlorida u odnosu na CP. Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja karvedilola iz tableta sa superdezintegratorom u jezgru (F7–F10), nisu bili zadovoljavajući jer oslobađanje karvedilola nije bilo potpuno (maksimalno 72% oslobođenog karvedilola) pa je zato izvršena modifikaciju formulacije. Već je pokazano u literaturi da osmotski ekscipijensi mogu imati uticaj na oslobađanje lekovite supstance. Formulacija tabletnih jezgara sa osmotskim ekscipijensom vodi do stvaranja osmotskog pritiska koji može obezbediti rupturu polimernog omotača i pulsno oslobađanje leka nakon *lag time* kod preparata tipa osmotske pumpe [Lin i sar., 2002]. Na osnovu visokih RPN vrednosti za uticaj natrijum-hlorida (NaCl) na *lag time* i količinu oslobođenog karvedilola iz obloženih tableta, ispitivan je i poređen njegov uticaj na ove CQAs u odnosu na SSG. Poređenje se vrši u odnosu na SSG, a ne na CP, jer je kroz ispitivanje predhodnih formulacija (F7–F10) pokazan veći značaj ovog ekscipijensa. Pripremljene su četiri tabletna formulacije (F11–F14, tabela 11). Izvedeno je ispitivanje brzine rastvaranja karvedilola i procenjen je uticaj ovih faktora na *lag time* i količinu oslobođenog karvedilola. Profili brzine rastvaranja karvedilola iz formulacija F11–F14, prikazani su na slici 25. Ovi eksperimenti sprovedeni su na osnovu eksperimentalnog plana iz Design Expert® Software i dobijene su matematičke jednačine (tabela 25).





Slika 25. Profili brzine rastvaranja karvedilola iz formulacija F11, F12, F13 i F14

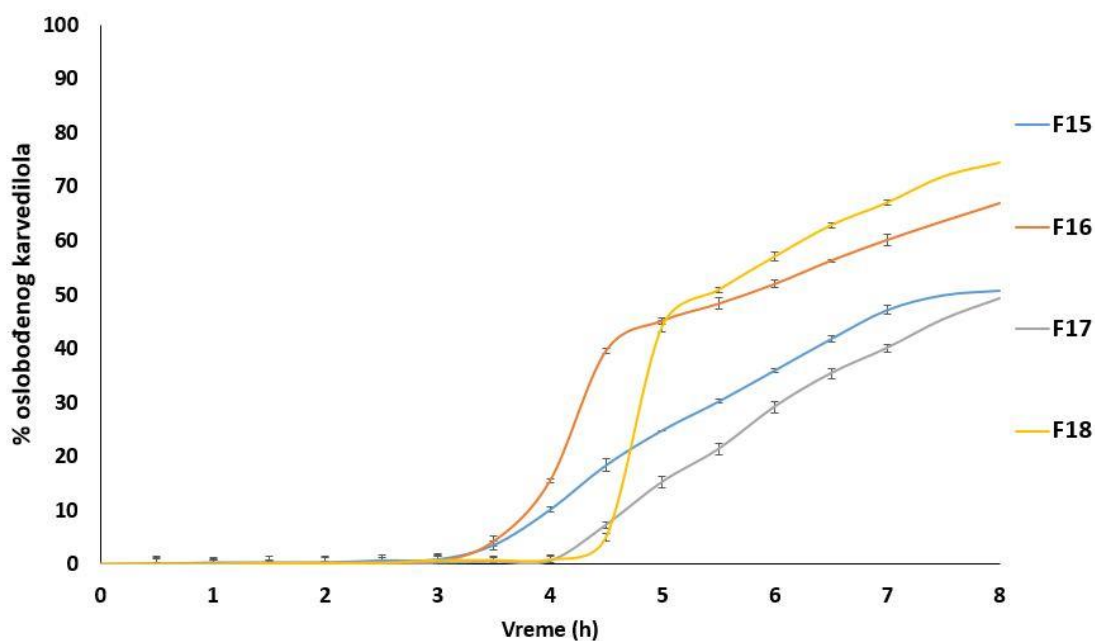
Tabela 25. Matematički modeli dobijeni uklapanjem rezultata  $2^2$  eksperimentalnog dizajna u model prvog reda za formulacije F11–F14

Zavisno promenljive	<i>lag time</i>	<b>Q</b>
Jednačine u kodiranim vrednostima	$Lag\ time = 4,20 - 0,35*B$	$Q = 76,43 + 8,26*B$
Jednačine u realnim vrednostima	$Lag\ time = 5,250 - 0,140*NaCl$	$Q = 51,660 + 3,303*NaCl$
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9202	0,9408
<b>p</b>	0,0407	0,03

Rezultati eksperimentalnog dizajna su pokazali da koncentracija NaCl, tj. nezavisno promenljiva B ima statistički značajan uticaj na obe zavisno promenljive (*lag time* i **Q**) ( $p < 0,05$ ). Posmatrajući efekte ovog faktora na *lag time*, na osnovu matematičke jednačine, vidi se da promena nivoa ovog faktora, sa nižeg na viši, dovodi do smanjenja

*lag time*. Na to ukazuje negativan predznak ispred koeficijenta uz faktor B. Sa druge strane, promena koncentracije NaCl (sa 0 na 10%) ima pozitivan efekat na količinu oslobođenog karvedilola (pozitivan predznak koeficijenta), što znači da sa povećanjem koncentracije NaCl dolazi do povećanja *Q*. U slučaju SSG (nezavisno promenljiva A), rezultati su pokazali da za ispitivana dva nivoa koncentracije 0 i 10%, nema statistički značajnog uticaja na zavisno promenljive. Formulacija F14 je pokazala sporije oslobađanje karvedilola u odnosu na F13, što je možda bilo neočekivano imajući u vidu da je u formulaciji F14 bio prisutan pored SSG, i NaCl. Ovo može biti objašnjeno kompetitivnim osobinama ovih ekscipijenasa tokom *lag time*, gde je NaCl kao osmotski agens brže apsorbavao vodu i ispoljio svoje dejstvo od SSG. Lin i sar. [2002] su pokazali da je natrijum-hlorid inkorporiran u tabletno jezgro mnogo pogodniji od SSG za dizajn tableta obloženih kompresijom. Na slici 22, izračunate RPN vrednosti SSG i NaCl, pokazuju da postoji razlika među ovim faktorima, kada se posmatra njihov uticaj na *lag time* i na *Q*. RPN za NaCl za *lag time* i *Q* su 105 i 95, respektivno, dok su za SSG, 60 i 72, respektivno. Potencijalni uzrok za odsustvo statističkog značaja uticaja koncentracije SSG na *lag time* i količinu oslobođenog karvedilola, može biti u izabranom opsegu ispitivanih koncentracija (0 i 10%).

Već je pomenuto da se i manitol često koristi u formulaciji tabletnog jezgra u tabletama obloženim kompresijom. Procena uticaja koncentracije manitola (nezavisno promenljiva A) u kombinaciji sa različitim koncentracijama Polyox WSR N60K (nezavisno promenljiva B), na CQAs, tj. zavisno promenljive *lag time* i količinu oslobođenog karvedilola, izvršena je primenom eksperimentalnog dizajna. Profili brzine rastvaranja karvedilola iz formulacija F15–F18, dati su na slici 26. Dobijene matematičke jednačine date su u tabeli 26.



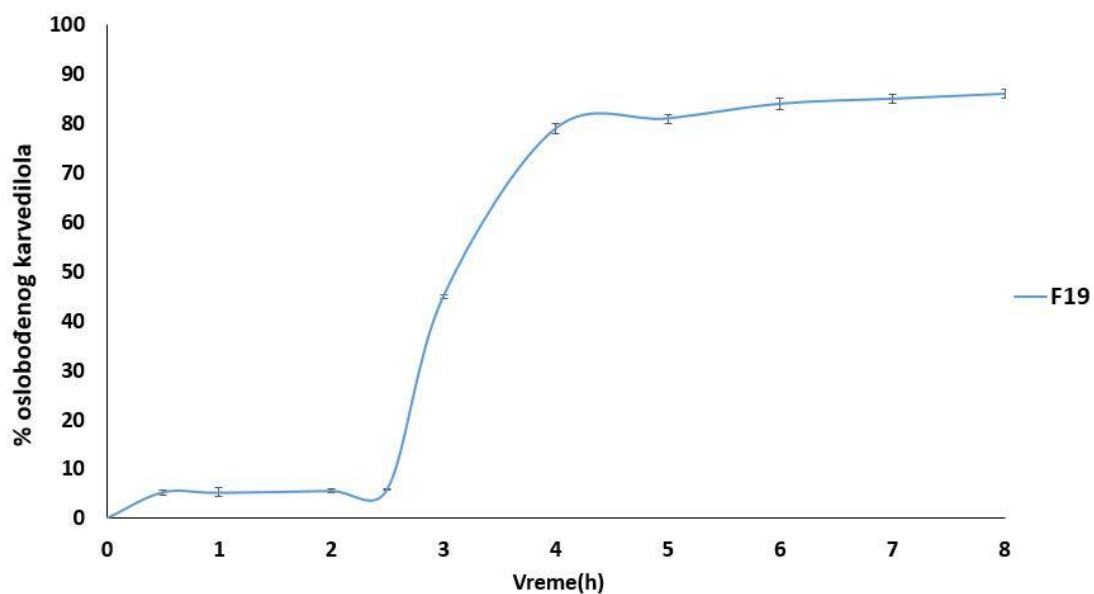
Slika 26. Profili brzine rastvaranja karvedilola iz formulacija F15, F16, F17 i F18

Tabela 26. Matematički modeli dobijeni uklapanjem rezultata  $2^2$  eksperimentalnog dizajna u model prvog reda za formulacije F15–F18

Zavisno promenljive	<i>lag time</i>	Q
Jednačine u kodiranim vrednostima	$Lag\ time = 3,92 + 0,4250*B$	$Q = 32,16 + 13,03*A$
Jednačine u realnim vrednostima	$Lag\ time = - 1,600 + 0,170*Polyox\ WSR\ N60K$	$Q = 1,7533 + 0,8688*Manitol$
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9414	0,9282
<b>p</b>	0,0298	0,0366

Rezultati dobijeni u Design Expert<sup>®</sup> Software su pokazali da koncentracija manitola ima statistički značajan uticaj na Q ( $p < 0,05$ ). Pozitivan predznak ispred faktora A u jednačini sa kodiranim vrednostima, govori o pozitivnom efektu ovog faktora na količinu oslobođenog karvedilola. Promenom nivoa faktora A sa nižeg na viši nivo, tj. povećanjem koncentracije manitola, dolazi do povećanja Q. Koncentracija Polyox N60K nema značajan uticaj na ovu zavisno promenljivu. Statistički značajan uticaj na *lag time* ima jedino koncentracija Polyoxa WSR N60K, i to ima pozitivan uticaj. Povećanjem koncentracije polimera, produžava se *lag time*. Rezultati pokazuju da koncentracija manitola nema statistički značajan uticaj na *lag time*. Uticaj koncentracije manitola na *lag time* u FMEA, okarakterisan je srednjim vrednostima RPN, pa je mogući razlog za izostanak njegovog statistički značajnog uticaja u eksperimentalnim rezultatima, opseg korišćenih koncentracija, što bi moglo biti u budućnosti detaljnije ispitano. Posmatranjem uticaja koje imaju ispitivane koncentracije natrijum-hlorida i manitola na *lag time* i Q, može se uočiti razlika između ova dva ekscipijensa iako oba pripadaju istoj grupi, osmotski aktivnih supstanci. Dobijeni rezultati su pokazali da koncentracija natrijum-hlorida ima statistički značajan uticaj i na *lag time* i na Q, dok koncentracija manitola utiče samo na Q, ne i na *lag time*. Formulacija F13, koja je sadržala 10% natrijum-hlorida, imala je *lag time* 4h, i približno 50% rastvorenog karvedilola u toku 30 minuta nakon *lag time*. Dok je F18, koja je sadržala 50% manitola, pokazala nešto duže *lag time* (4,5 h), i približno 50% oslobođenog karvedilola u toku 30 minuta nakon *lag time*. Osim ove razlike u dužini odlaganja oslobađanja, razlikuje se i ukupna količina oslobođenog karvedilola, koja je kod formulacije sa natrijum-hloridom (F13) bila približno 90%, a kod formulacije sa manitolom (F18) približno 80%, tokom trajanja ukupnog ispitivanja (8h). Obe formulacije su imale 35% Polyox WSR N60K u omotaču, tako da se uočene razlike u rezultatima između ove dve formulacije, mogu direktno pripisati različitoj vrsti osmotski aktivne supstance.

U poslednjoj fazi izvedeno je ispitivanje brzine rastvaranja karvedilola iz tableta obloženih kompresijom, koje su u jezgru sadržale komprimovana nanovlakana Soluplus<sup>®</sup>-a i karvedilola (tabela 10). Rezultati ispitivanja brzine rastvaranja karvedilola iz tableta koje su sadržale nanovlakna u jezgru, F19 prikazani su na slici 27.



Slika 27. Brzina rastvaranja karvedilola iz formulacije F19

U poređenju kritičnih atributa kvaliteta ovih tableta i tableta koje su u jezgru imale konvencionalne ekscipijense (SSG, NaCl), može se videti da je *lag time* u slučaju formulacije F19 kraće od prethodnih. Poređenjem formulacije F19 i drugih formulacija sa istom koncentracijom Polyox WSR N60K (tabela 27), mogu se videti razlike i u vrednosti *lag time*, ali i u brzini rastvaranja karvedilola.

Tabela 27. Poređenje formulacija koje su sadržale 35% Polyox WSR N60K

Formulacije	Sastav jezgra	Lag time	Q <sub>30</sub> (%)	Q <sub>60</sub> (%)	Q (%)
F9	16% SSG	3,5	13	20	63
F10	16% CP	4,0	7	8	27
F12	10% SSG	5,5	26	35	54
F13	10% NaCl	4,0	46	67	90
F14	10% SSG i 10% NaCl	3,5	11	19	79
F17	20% manitola	5,5	29	35	49
F18	50% manitola	4,5	44	50	74
F19	nanovlakna	2,5	46	64	85

Za navedene formulacije koje su imale 35% Polyox WSR N60K u omotaču, može se videti da je vrednost *lag time* bila između 2,5 i 5,5. Najkraće *lag time* (2,5 h) je bilo u slučaju formulacije F19, koja je sadržala nanovlakna Soluplus<sup>®</sup>-a impregniranih karvedilolom, dok je najduže (5,5 h) bilo kod formulacija F12 (10% SSG) i F17 (20% manitola). Što se tiče ostalih posmatranih parametara, poređeni su  $Q_{30}$  i  $Q_{60}$  koji predstavljaju količinu rastvorenog karvedilola tokom 30, odnosno 60 minuta nakon *lag time*, i  $Q$  koji podrazumeva ukupnu količinu rastvorenog karvedilola. Može se videti da su najveće vrednosti sva tri parametra u slučaju formulacija F13, koja je u jezgru sadržala 10% natrijum-hlorida, i formulacije F19, koja je sadržala nanovlakna Soluplus<sup>®</sup>-a impregniranih karvedilolom. Približne vrednosti za  $Q_{30}$  i  $Q_{60}$ , i  $Q$  za formulacije F13 i F19 ukazuju na uticaj sastava formulacije tabletnog jezgra. Brzina rastvaranja karvedilola iz samih jezgara,  $q$ , Fj4 (F13) i Fj6 (F19) se razlikovala samo u prvih 15 minuta dok je ukupna količina rastvorenog karvedilola bila približnih vrednosti, 91% za Fj4 i 96% za Fj6. Međutim, vrednosti *lag time* su bile različite za ove dve formulacije, i pored iste koncentracije polimera u omotaču. Kraći *lag time* primećen je kod F19, što se može tumačiti bržim rastvaranjem karvedilola u obliku čvrste disperzije. Sa druge strane, duži *lag time* kod F13, može biti posledica toga što je potrebno duže vreme za generisanje određenog osmotskog pritiska koji dovodi do pucanja omotača obložene tablete i oslobađanja, tj. rastvaranja karvedilola. Sa aspekta QTPP (tabela 9), približnija zahtevima za CQAs za terapijske sisteme sa pulsним oslobađanjem, je formulacija F13, koja je sadržala 10% natrijum-hlorida u jezgru, jer je *lag time* bilo 4h, što je postavljeno kao zahtev za ovaj kritični atribut kvaliteta proizvoda. Formulacija F19, pre svega formulacija omotača, bi mogla biti dodatno modifikovana u cilju postizanja QTPP za terapijske sisteme sa pulsним oslobađanjem, pre svega u cilju produženja *lag time*.

U literaturi postoji malo podataka o formulaciji tableta kompresijom nanovlakana, dok ih o oblaganju kompresijom tabletnih jezgara koja sadrže nanovlakna praktično nema [Démuth i sar., 2017]. Razlog za to leži u velikom izazovu kada se govori o usitnjavanju samih vlakana, kao i o mogućnosti *scale up*-a procesa.

## 5.0 Zaključak

Farmaceutski razvoj tableta sa pulsним oslobađanjem karvedilola razmatran je kroz primenu dve tehnike, oblaganja kompresijom i elektropredenja. Uočen je veliki broj formulacionih i procesnih parametara koji mogu uticati na kritične attribute kvaliteta tableta obloženih kompresijom, i njihov uticaj je procenjivan primenom različitih tehnika analize rizika i eksperimentalnog dizajna. Eksperimentalni rad je izveden u 4 faze i zaključci svake od faza su posebno prikazani u nastavku.

### Zaključak prve faze eksperimentalnog istraživanja

- Primenom kvalitativne metode za određivanje stepena mešanja karvedilola i Soluplus<sup>®</sup>-a, dobijena vrednost razlike ukupnog parametra rastvorljivosti lekovite supstance i polimera ( $5,1 \text{ MPa}^{1/2}$ ) pokazala je da postoji verovatnoća za mešanje ove dve komponente jer je vrednost izračunate razlike manja od granične vrednosti koja iznosi  $7 \text{ MPa}^{1/2}$ . Nakon kvalitativne, primenjena je i kvantitativna metoda određivanja *Flory-Huggins* interakcionog parametra metodom određivanja snižavanja tačke topljenja. Dobijena vrednost interakcionog parametra od  $-2,3054$  pokazuje da dolazi do mešanja karvedilola i Soluplus<sup>®</sup>-a, jer negativne vrednosti interakcionog parametra ukazuju da postoji mešanje komponentata u sistemu. Da do mešanja ove dve komponente dolazi, pokazano je i analizom termograma fizičkih smeša karvedilola i Soluplus<sup>®</sup>-a sa različitim udelom lekovite supstance, gde je pokazano da sa povećanjem udela polimera u smeši, dolazi do snižavanja početka tačke topljenja karvedilola.

### Zaključak druge faze eksperimentalnog rada

- Na osnovu rezultata prve faze istraživanja, i zaključka o postojanju mešanja u sistemu karvedilola i Soluplus<sup>®</sup>-a, pristupljeno je mapiranju regiona rastvorljivosti Soluplus<sup>®</sup>-a u cilju odabira odgovarajućeg rastvarača ili sistema rastvarača u kojima je polimer rastvorljiv. Napravljen je *Teas* grafik kao svojevrsna mapa za izbor pogodnih rastvarača za Soluplus<sup>®</sup>, na osnovu njihovih frakcionih parametara rastvorljivosti. Od 15 početno testiranih rastvarača, na

osnovu mapiranog regiona, 8 odgovarajućih rastvarača je bilo odabrano i to: aceton, hloroform, smeša aceton: hloroform (90:10 (m/m)), smeša aceton: hloroform (70:30 (m/m)), etanol, metanol, sirćetna kiselina i voda. U ovoj fazi je na osnovu dielektrične konstante, i sa aspekta rastvaranja karvedilola, izabrano 5 rastvarača i dalje procenjeno. Za probno elektropredenje izabrano je 5 rastvarača: aceton, etanol, metanol, kao i smeša acetona i hloroforma u odnosu 90:10 (m/m) i 70:30 (m/m). Pri čemu je posmatranjem pod optičkim mikroskopom dobijenih nanovlakana, smeša rastvarača aceton:hloroform (90:10 m/m) odbrana kao optimalna.

- Elektropredenjem 20% rastvora Soluplusa u smeši rastvarača aceton:hloroform (90:10 m/m) sa različitim udelom karvedilola (N1-N6) dobijena su nanovlakna. Izvršena je karakterizacija dobijenih vlakana. SEM analiza je pokazala da su formirana nanovlakna, glatke, uniformne površine i strukture. Proširenja su se češće pojavljivala na nanovlaknima sa manim udelom karvedilola. Izostanak kristala leka na površini vlakana na mikrografijama pokazuje da je došlo do inkorporiranja karvedilola u Soluplus<sup>®</sup> nanovlakna.
- DSC analizom nanovlakana, pokazano je odsustvo karakterističnog pika karvedilola u svim formulacijama (N1-N6) što može ukazivati na postojanje nekristalne strukture karvedilola, tj. njegovog amorfnog oblika. Ovaj zaključak se oslanja na zaključke prve faze istraživanja gde je pokazano da dolazi do mešanja karvedilola i Soluplus<sup>®</sup>-a na molekulskom nivou.
- IR spektroskopska analiza sa Furijeovom transformacijom pokazala je izostanak karakterističnog pika za karvedilol na 3344,5 koji odgovara N-H istezanju. Ovo može biti protumačeno kao moguća interakcija između –NH grupe karvedilola i –CO grupe Soluplusa, što bi vodilo do formiranja amidne grupe u nanovlaknima.
- Na osnovu rezultata *in vitro* brzine rastvaranja karvedilola iz dobijenih nanovlakana, pokazano je da se u svim slučajevima povećava brzina rastvaranja u odnosu na kristalni karvedilol. Sadržaj karvedilola u nanovlaknima bio je od 84 do 93%. Više od 95% karvedilola je bilo oslobođeno nakon 1 sata ispitivanja, pri čemu se može zaključiti da se primena elektropredenja uz Soluplus<sup>®</sup> kao polimer može koristiti za povećanje brzine rastvaranja slabo rastvorne lekovite supstance, karvedilola.



### Zaključak treće faze eksperimentalnog rada

- Trenutno oslobađanje karvedilola iz tabletnih jezgara dobijenih korišćenjem konvencionalnih ekscipijenasa i kompresijom usitnjenih nanovlakana je postignuto. Trenutno oslobađanje se postiže iz svih formulacija. Razlika u profilima postojala je u prvih 15 minuta oslobađanja, gde je kod formulacije Fj6 tableta sa nanovlaknima oslobođeno više od 85% karvedilola, što odgovaraa veoma brzom rastvaranju, dok je kod ostalih formulacija ovaj procenat bio oslobođen nakon 30 minuta. Zaključuje se da je ova uočena razlika zapravo posledica različitog pristupa za modifikaciju brzine rastvaranja teško rastvorne lekovite supstance, i da je, u ovom slučaju, mehanizam kojim čvrste disperzije modifikuju rastvorljivost, tj. brzinu rastvaranja karvedilola imao veći uticaj od primene konvencionalnih pomoćnih supstanci. Razlika između ovih formulacija je bila uočljiva u toku prvih 15 minuta ispitivanja brzine rastvaranja karvedilola, dok se profili na samom kraju testa ne razlikuju međusobno, na osnovu čega se može zaključiti da je postignuto trenutno i potpuno oslobađanje.

### Zaključak četvrte faze eksperimentalnog rada

- Pre formulacije tabletnog jezgra za tablete obložene kompresijom sprovedena je analiza rizika. Na osnovu rezultata preliminarne analize rizika pokazano je koji faktori su sa najvećim rizikom za sam proces oblaganja kompresijom. Ovi rezultati su poslužili za upotrebu FMEA, i razvoj formulacije tableta obloženih kompresijom.
- Za potrebe FMEA su formulisana 3 kritična atributa kvaliteta tableta obloženih kompresijom (*lag time*, ukupan procenat oslobođenog karvedilola **Q**, i količina oslobođenog karvedilola iz tabletnih jezgara, **q**). Izračunate RPN vrednosti za **q**, koje se tiču tabletnog jezgra, bile su u saglasnosti sa rezultatima treće faze istraživanja gde je pokazan nizak uticaj faktora kao što su kompresiona sila ili uticaj konvencionalnih ekscipijenasa. Izračunate RPN vrednosti su bile izuzetno visoke za parametre kao što su molekulska masa

polimera u omotaču, kompresiona sila u toku oblaganja i koncentracija polimera.

- Pripremljene su tablete sa različitim sastavom omotača. Pokazano je da su Polyox polimeri velikih molekulskih masa nepovoljni za ovakav tip farmaceutskih preparata. Za Polyox N60K postignuto je odlaganje oslobađanja karvedilola za 2,5-5,5 h; ukoliko je korišćena koncentracija 30 ili 35%, dok su niže koncentracije dovodile do prevremenog oslobađanja karvedilola. U ovoj fazi nije postignuto potpuno oslobađanje karvedilola pa je izvršena modifikacija tabletnog jezgra i procena uticaja formulacionih parametara na CQAs. Pokazano je da postoji statistički značajan uticaj tipa korišćenog dezintegratora (krospovidon, natrijum-skobglikolat) na **Q**, gde je veća količina karvedilola oslobođena iz formulacije koja sadrži SSG i 30% Polyoxa N60K, nego u slučaju formulacija sa krospovidonom i većom koncentracijom polimera u omotaču. Zatim je procenjivan uticaj osmotski aktivnih supstanci, natrijum-hlorida i manitola. Pokazano je da je koncentracija natrijum-hlorida imala statistički značajan uticaj na **Q** i *lag time*, u poređenju sa SSG gde povećanje njegove koncentracije nije pokazalo statistički značajan uticaj na ove dve CQAs. Koncentracija manitola u formulaciji tabletnog jezgra, uz variranje koncentracije Polyox WSR N60K u omotaču, pokazala je statistički značajan uticaj na **Q**, ali ne i na *lag time*. Ovde se lako uočava razlika između uticaja koncentracije natrijum-hlorida i manitola na praćene CQAs.
- U poslednjoj fazi, rezultati *in vitro* ispitivanja brzne rastvaranja karvedilola iz tableta obloženih kompresijom koja su sadržala 35% Polyox N60K u omotaču, i karvedilol-Soluplus<sup>®</sup> usitnjenih nanovlakana u jezgru. Pokazan je uticaj formulacije jezgra na *lag time*, koje je bilo skraćeno u odnosu na tablete ispitivane u prethodnoj fazi. Količina rastvorenog karvedilola u toku 1 h nakon *lag time* bila je 64%, što je jedna od najviših vrednosti za formulacije sa 35% polimera u omotaču. Formulacije sa 10% natrijum-hlorida u jezgru su pokazale sličnu brzinu rastvaranja karvedilola kao i formulacije sa nanovlaknima, uz duži *lag time*. Na osnovu čega se može zaključiti da se karvedilol u obliku čvrste disperzije sa Soluplus<sup>®</sup>-om u nanovlaknima brže

rastvarao u odnosu na karvedilol iz drugih jezgara koja su sadržala superdezintegratore ili manitol.

- Rezultati su pokazali da veliki broj faktora utiče na postizanje zadovoljavajuće brzine rastvaranja karvedilola iz tableta obloženih kompresijom. Na osnovu rezultata ispitivanja brzine rastvaranja karvedilola, može se zaključiti da je postignuto odloženo oslobađanje karvedilola uz oslobađanje pulsa od maksimalno 67% rastvorenog karvedilola u toku 1 h nakon *lag time* od 4 h, što se može smatrati zadovoljavajućim sa aspekta hronoterapije. Sa aspekta QTPP, približnija zahtevima za CQAs za terapijske sisteme sa pulsним oslobađanjem, je formulacija koja je sadržala 10% natrijum-hlorida u jezgru, jer je *lag time* bilo 4h, što je postavljeno kao zahtev za ovaj kritični atribut kvaliteta proizvoda. Formulacija tableta sa nanovlaknima, tačnije formulacija omotača, bi mogla biti dodatno modifikovana u cilju postizanja QTPP za terapijske sisteme sa pulsним oslobađanjem, pre svega u cilju produžetka *lag time*.

## 6.0 Literatura

1. Armstrong, N. A. (2006). *Pharmaceutical experimental design and interpretation*. CRC Press.
2. Alam, M. A., Ali, R., Al-Jenoobi, F. I., & Al-Mohizea, A. M. (2012). Solid dispersions: a strategy for poorly aqueous soluble drugs and technology updates. *Expert opinion on drug delivery*, 9(11), 1419-1440.
3. Alhalaweh, A., Alzghoul, A., & Kaialy, W. (2014). Data mining of solubility parameters for computational prediction of drug–excipient miscibility. *Drug development and industrial pharmacy*, 40(7), 904-909.
4. Altamimi, M. A., & Neau, S. H. (2016). Use of the Flory–Huggins theory to predict the solubility of nifedipine and sulfamethoxazole in the triblock, graft copolymer Soluplus. *Drug development and industrial pharmacy*, 42(3), 446-455.
5. Ambedkar Sunil, S., Venkata Srikanth, M., Sreenivasa Rao, N., & Venkata Ramana Murthy, K. (2013). Chronotherapeutic drug delivery from indomethacin compression coated tablets for early morning pain associated rheumatoid arthritis. *Current drug delivery*, 10(1), 109-121.
6. Arayanarakul, K., Choktaweasap, N., Aht-ong, D., Meechaisue, C., & Supaphol, P. (2006). Effects of poly (ethylene glycol), inorganic salt, sodium dodecyl sulfate, and solvent system on electrospinning of poly (ethylene oxide). *Macromolecular Materials and Engineering*, 291(6), 581-591.
7. Augustine, R., Kalarikkal, N., & Thomas, S. (2016). Clogging-free electrospinning of polycaprolactone using acetic acid/acetone mixture. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 55(5), 518-529.
8. Babu, V. R., Areefulla, S. H., & Mallikarjun, V. (2010). Solubility and dissolution enhancement: an overview. *Journal of pharmacy research*, 3(1), 141-145.
9. Baird, J. A., & Taylor, L. S. (2012). Evaluation of amorphous solid dispersion properties using thermal analysis techniques. *Advanced drug delivery reviews*, 64(5), 396-421.
10. Barends, D. M., Oldenhof, M. T., Vredenburg, M. J., & Nauta, M. J. (2012). Risk analysis of analytical validations by probabilistic modification of FMEA. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 64, 82-86.
11. Barton, A. F. M. (1983) *CRC Handbook of Solubility Parameters and Other Cohesion Parameters*. CRC Press Inc, Florida, USA
12. BASF, (2019). Soluplus® For Better Solubility and Bioavailability. <https://pharmaceutical.basf.com/en/Drug-Formulation/Soluplus.html>, pristupljeno maja 2019
13. Beachley, V., Wen, X., 2010. Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions. *Prog. Polym. Sci.* 35, 86 8– 892.
14. Bhardwaj, N., Kundu, S.C., 2010. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol. Adv.* 28, 325– 347.
15. Bhattarai, N., Edmondson, D., Veiseh, O., Matsen, F. A., & Zhang, M. (2005). Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. *Biomaterials*, 26(31), 6176-6184.
16. Bonnabry, P., Cingria, L., Sadeghipour, F., Ing, H., Fonzo-Christe, C., & Pfister, R. E. (2005). Use of a systematic risk analysis method to improve safety in the

- production of paediatric parenteral nutrition solutions. *BMJ Quality & Safety*, 14(2), 93-98.
17. Bose, S., & Bogner, R. H. (2010). Solventless visible light-curable coating: I. Critical formulation and processing parameters. *International journal of pharmaceutics*, 393(1-2), 32-40.
  18. Burke, J. (1984). Solubility parameters: theory and application.
  19. Bussemer, T., Otto, I., & Bodmeier, R. (2001). Pulsatile drug-delivery systems. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 18(5).
  20. Conte, U., Maggi, L., Torre, M. L., Giunchedi, P., & La Manna, A. (1993). Press-coated tablets for time-programmed release of drugs. *Biomaterials*, 14(13), 1017-1023.
  21. Démuth, B., Farkas, A., Szabó, B., Balogh, A., Nagy, B., Vágó, E., ... & Bertels, J. (2017). Development and tableting of directly compressible powder from electrospun nanofibrous amorphous solid dispersion. *Advanced Powder Technology*, 28(6), 1554-1563.
  22. Démuth, B., Nagy, Z. K., Balogh, A., Vigh, T., Marosi, G., Verreck, G., Van Assche, I., & Brewster, M. E. (2015). Downstream processing of polymer-based amorphous solid dispersions to generate tablet formulations. *International journal of pharmaceutics*, 486(1-2), 268-286.
  23. Ding, B., Wang, M., Wang, X., Yu, J., & Sun, G. (2010). Electrospun nanomaterials for ultrasensitive sensors. *Materials Today*, 13(11), 16-27.
  24. Djuris, J., Nikolakakis, I., Ibric, S., Djuric, Z., & Kachrimanis, K. (2013). Preparation of carbamazepine–Soluplus® solid dispersions by hot-melt extrusion, and prediction of drug–polymer miscibility by thermodynamic model fitting. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 84(1), 228-237.
  25. Doshi, J., & Reneker, D. H. (1995). Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *Journal of electrostatics*, 35(2-3), 151-160.
  26. Drug Bank, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01136>, pristupljeno maja 2019.
  27. European Pharmacopoeia, 9th edition. Strasbourg: Council of Europe, 2019.
  28. Fahmy, R., Kona, R., Dandu, R., Xie, W., Claycamp, G., & Hoag, S. W. (2012). Quality by design I: application of failure mode effect analysis (FMEA) and Plackett–Burman design of experiments in the identification of “main factors” in the formulation and process design space for roller-compacted ciprofloxacin hydrochloride immediate-release tablets. *AAPS PharmSciTech*, 13(4), 1243-1254.
  29. FDA (2017), Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. Guidance for Industry. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/waiver-vivo-bioavailability-and-bioequivalence-studies-immediate-release-solid-oral-dosage-forms>, pristupljeno maja 2019.
  30. Frezzotti, D., & Ravanetti, G. (1994). Evaluation of the flory-huggins interaction parameter for poly (styrene-co-acrylo-nitrile) and poly (methyl-methacrylate) blend from enthalpy of mixing measurements. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 41(6), 1237-1243.
  31. Frone, A. N., Berlioz, S., Chailan, J. F., & Panaitescu, D. M. (2013). Morphology and thermal properties of PLA–cellulose nanofibers composites. *Carbohydrate Polymers*, 91(1), 377-384.

32. García-Rodríguez, J. J., Paloma, M., Vegas-Sánchez, M. C., Torrado-Durán, S., Bolás-Fernández, F., & Torrado-Santiago, S. (2011). Changed crystallinity of mebendazole solid dispersion: improved anthelmintic activity. *International journal of pharmaceutics*, 403(1-2), 23-28.
33. Gest, S., Legenbauer, T., Bogen, S., Schulz, C., Pniewski, B., & Holtmann, M. (2014). Chronotherapeutics: an alternative treatment of juvenile depression. *Medical hypotheses*, 82(3), 346-349.
34. Greenberg, B. H., Mehra, M., Teerlink, J. R., Ordroneau, P., McCollum, D., & Gilbert, E. M. (2006). COMPARE: comparison of the effects of carvedilol CR and carvedilol IR on left ventricular ejection fraction in patients with heart failure. *The American journal of cardiology*, 98(7), 53-59.
35. Greenhalgh, D. J., Williams, A. C., Timmins, P., & York, P. (1999). Solubility parameters as predictors of miscibility in solid dispersions. *Journal of pharmaceutical sciences*, 88(11), 1182-1190.
36. Guideline, I. H. T. (2005, November). Quality risk management Q9. In *International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use*.
37. Guideline, I. H. T. (2008). Pharmaceutical quality system q10. Current Step, 4. In *International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use*.
38. Guideline, I. H. T. (2009). Pharmaceutical development Q8. Current Step, 4, 11. In *International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use*.
39. Guimaraes, A. , Martins, A. , Pinho, E.D., Faria, S., Reis, R.L., Neves, N.M., 2010. Solving cell in filtration limitations of electrospun nano fiber meshes for tissue engineering applications. *Nanomedicine (Lond.)* 5, 539– 554.
40. Gupta, P. R., Shende, M. A., & Shaikh, D. M. (2013). Ordinal logistic regression model of failure mode and effect analysis (FMEA) in direct compressible buccal tablet. *International Journal of Pharma Research & Review*, 2(6), 9-17.
41. Halsas, M., Ervasti, P., Veski, P., Jürjenson, H., & Marvola, M. (1998). Biopharmaceutical evaluation of time-controlled press-coated tablets containing polymers to adjust drug release. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 23(2), 190-196.
42. Hamed, R., Awadallah, A., Sunoqrot, S., Tarawneh, O., Nazzal, S., AlBaraghthi, T., ... & Abbas, A. (2016). pH-dependent solubility and dissolution behavior of carvedilol—case example of a weakly basic BCS class II drug. *AAPS PharmSciTech*, 17(2), 418-426.
43. Hancock, B. C., & Zografi, G. (1997). Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems. *Journal of pharmaceutical sciences*, 86(1), 1-12.
44. Hansen, C. M. (1967). *The three dimensional solubility parameter*. Danish Technical: Copenhagen, 14.
45. Hansen, C. M. (2007). *Hansen solubility parameters: a user's handbook*. CRC press.
46. Hariharan, M., & Gupta, V. K. (2001). A novel compression-coated tablet dosage form. *Pharmac. Technol*, 14-19.
47. Hildebrand, J. H., & Scott, R. L. (1964). *The solubility of nonelectrolytes*. New York: Dover Publications.

48. Hirasawa, N., Ishise, S., Miyata, H., & Danjo, K. (2004). Application of nilvadipine solid dispersion to tablet formulation and manufacturing using crospovidone and methylcellulose as dispersion carriers. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 52(2), 244-247.
49. Huang, Z. M., Zhang, Y. Z., Kotaki, M., & Ramakrishna, S. (2003). A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites science and technology*, 63(15), 2223-2253.
50. Ignatious, F., & Baldoni, J. (2003). U.S. Patent Application No. 10/181,640.
51. Ignatious, F., Sun, L., Lee, C. P., & Baldoni, J. (2010). Electrospun nanofibers in oral drug delivery. *Pharmaceutical research*, 27(4), 576-588.
52. Jaeger, R., Bergshoef, M. M., Batlle, C. M. I., Schönherr, H., & Julius Vancso, G. (1998, February). Electrospinning of ultra-thin polymer fibers. In *Macromolecular symposia* (Vol. 127, No. 1, pp. 141-150). Basel: Hüthig & Wepf Verlag.
53. Janković, B., Pelipenko, J., Škarabot, M., Mušević, I., & Kristl, J. (2013). The design trend in tissue-engineering scaffolds based on nanomechanical properties of individual electrospun nanofibers. *International journal of pharmaceutics*, 455(1), 338-347.
54. Jarusuwannapoom, T., Hongrojjanawiwat, W., Jitjaicham, S., Wannatong, L., Nithitanakul, M., Pattamaprom, C., ... & Supaphol, P. (2005). Effect of solvents on electro-spinnability of polystyrene solutions and morphological appearance of resulting electrospun polystyrene fibers. *European Polymer Journal*, 41(3), 409-421.
55. Kenneth, W. D. (2004). *The FMEA Pocket Handbook*.
56. Khan, Z., Choonara, Y. E., Kumar, P., du Toit, L. C., Ndesendo, V. M., & Pillay, V. (2013). A novel multilayered multidisk oral tablet for chronotherapeutic drug delivery. *BioMed research international*, 2013.
57. Klang, V., Valenta, C., & Matsko, N. B. (2013). Electron microscopy of pharmaceutical systems. *Micron*, 44, 45-74.
58. Kovačič, B., Vrečer, F., & Planinšek, O. (2011). Solid dispersions of carvedilol with porous silica. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 59(4), 427-433.
59. Lawrence, X. Y. (2008). Pharmaceutical quality by design: product and process development, understanding, and control. *Pharmaceutical research*, 25(4), 781-791.
60. Lawrence, X. Y., Amidon, G., Khan, M. A., Hoag, S. W., Polli, J., Raju, G. K., & Woodcock, J. (2014). Understanding pharmaceutical quality by design. *The AAPS journal*, 16(4), 771-783.
61. Lee, J., & Deng, Y. (2012). Increased mechanical properties of aligned and isotropic electrospun PVA nanofiber webs by cellulose nanowhisiker reinforcement. *Macromolecular research*, 20(1), 76-83.
62. Li, J., & Chiappetta, D. (2008). An investigation of the thermodynamic miscibility between VeTPGS and polymers. *International journal of pharmaceutics*, 350(1-2), 212-219.
63. Li, J., He, A., Zheng, J., & Han, C. C. (2006). Gelatin and gelatin-hyaluronic acid nanofibrous membranes produced by electrospinning of their aqueous solutions. *Biomacromolecules*, 7(7), 2243-2247.
64. Lin, S. Y., & Kawashima, Y. (2012). Current status and approaches to developing press-coated chronodelivery drug systems. *Journal of controlled release*, 157(3), 331-353.

65. Lin, S. Y., Lin, K. H., & Li, M. J. (2002). Influence of excipients, drugs, and osmotic agent in the inner core on the time-controlled disintegration of compression-coated ethylcellulose tablets. *Journal of pharmaceutical sciences*, 91(9), 2040-2046.
66. Lionberger, R. A., Lee, S. L., Lee, L., Raw, A., & Lawrence, X. Y. (2008). Quality by design: concepts for ANDAs. *The AAPS journal*, 10(2), 268-276.
67. Liu, G., Hoch, M., Wrana, C., Kulbaba, K., & Qiu, G. (2013). A new way to determine the three-dimensional solubility parameters of hydrogenated nitrile rubber and the predictive power. *Polymer Testing*, 32(6), 1128-1134.
68. Loftsson, T., Vogensen, S. B., Desbos, C., & Jansook, P. (2008). Carvedilol: solubilization and cyclodextrin complexation: a technical note. *AAPs PharmSciTech*, 9(2), 425-430.
69. Luo, C. J., Nangrejo, M., & Edirisinghe, M. (2010). A novel method of selecting solvents for polymer electrospinning. *Polymer*, 51(7), 1654-1662.
70. Luo, C. J., Stride, E., & Edirisinghe, M. (2012). Mapping the influence of solubility and dielectric constant on electrospinning polycaprolactone solutions. *Macromolecules*, 45(11), 4669-4680.
71. Ma, L., Deng, L., & Chen, J. (2014). Applications of poly (ethylene oxide) in controlled release tablet systems: a review. *Drug development and industrial pharmacy*, 40(7), 845-851.
72. Mandal, A. S., Biswas, N., Karim, K. M., Guha, A., Chatterjee, S., Behera, M., & Kuotsu, K. (2010). Drug delivery system based on chronobiology—A review. *Journal of controlled release*, 147(3), 314-325.
73. Maroni, A., Zema, L., Del Curto, M. D., Loreti, G., & Gazzaniga, A. (2010). Oral pulsatile delivery: rationale and chronopharmaceutical formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 398(1-2), 1-8.
74. Marsac, P. J., Li, T., & Taylor, L. S. (2009). Estimation of drug–polymer miscibility and solubility in amorphous solid dispersions using experimentally determined interaction parameters. *Pharmaceutical research*, 26(1), 139-151.
75. Marsac, P. J., Shamblin, S. L., & Taylor, L. S. (2006). Theoretical and practical approaches for prediction of drug–polymer miscibility and solubility. *Pharmaceutical research*, 23(10), 2417.
76. Meng, F., Dave, V., & Chauhan, H. (2015). Qualitative and quantitative methods to determine miscibility in amorphous drug–polymer systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 77, 106-111
77. Nagy, Z. K., Balogh, A., Vajna, B., Farkas, A., Patyi, G., Kramarics, Á., & Marosi, G. (2012). Comparison of electrospun and extruded Soluplus®-based solid dosage forms of improved dissolution. *Journal of pharmaceutical sciences*, 101(1), 322-332.
78. Nainwal, N. (2012). Chronotherapeutics—A chronopharmaceutical approach to drug delivery in the treatment of asthma. *Journal of controlled release*, 163(3), 353-360.
79. Ozeki, Y., Ando, M., Watanabe, Y., & Danjo, K. (2004). Evaluation of novel one-step dry-coated tablets as a platform for delayed-release tablets. *Journal of controlled release*, 95(1), 51-60.
80. Paaver, U., Tamm, I., Laidmäe, I., Lust, A., Kirsimäe, K., Veski, P., ... & Heinämäki, J. (2014). Soluplus Graft copolymer: potential novel carrier polymer in electrospinning of nanofibrous drug delivery systems for wound therapy. *BioMed research international*, 2014.
81. Patel, H., Parmar, S., & Patel, B. (2013). A comprehensive review on Quality by Design (QbD) in pharmaceuticals. *development*, 4, 5.



82. Patel, M., Tekade, A., Gattani, S., & Surana, S. (2008). Solubility enhancement of lovastatin by modified locust bean gum using solid dispersion techniques. *AAPS PharmSciTech*, 9(4), 1262-1269.
83. Pelipenko, J., Kocbek, P., & Kristl, J. (2015). Critical attributes of nanofibers: Preparation, drug loading, and tissue regeneration. *International journal of pharmaceuticals*, 484(1), 57-74.
84. Pelipenko, J., Kristl, J., Janković, B., Baumgartner, S., & Kocbek, P. (2013a). The impact of relative humidity during electrospinning on the morphology and mechanical properties of nanofibers. *International journal of pharmaceuticals*, 456(1), 125-134.
85. Pelipenko, J., Kocbek, P., Govedarica, B., Rošic, R., Baumgartner, S., & Kristl, J. (2013b). The topography of electrospun nanofibers and its impact on the growth and mobility of keratinocytes. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceuticals*, 84(2), 401-411.
86. Poller, B., Strachan, C., Broadbent, R., & Walker, G. F. (2017). A minitab formulation made from electrospun nanofibers. *European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceuticals*, 114, 213-220.
87. Potrč, T., Baumgartner, S., Roškar, R., Planinšek, O., Lavrič, Z., Kristl, J., & Kocbek, P. (2015). Electrospun polycaprolactone nanofibers as a potential oromucosal delivery system for poorly water-soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75, 101-113.
88. Prabhu, S., Ortega, M., & Ma, C. (2005). Novel lipid-based formulations enhancing the in vitro dissolution and permeability characteristics of a poorly water-soluble model drug, piroxicam. *International journal of pharmaceuticals*, 301(1-2), 209-216.
89. Qiu, Y., Chen, Y., Zhang, G. G., Yu, L., & Mantri, R. V. (Eds.). (2016). *Developing solid oral dosage forms: pharmaceutical theory and practice*. Academic press.
90. Ramakrishna, S. (2005). *An introduction to electrospinning and nanofibers*. World Scientific.
91. Rani, M. J., Vanka, E., Babu, A. S., & Rao, P. V. (2013). An Overview on Pulsatile Drug Delivery System. *PharmaTutor*, 1(2), 17-22.
92. Rasool, M. F., Khalil, F., & Läer, S. (2015). A Physiologically Based Pharmacokinetic Drug–Disease Model to Predict Carvedilol Exposure in Adult and Paediatric Heart Failure Patients by Incorporating Pathophysiological Changes in Hepatic and Renal Blood Flows. *Clinical pharmacokinetics*, 54(9), 943-962.
93. Reddy, G. S., Nayak, U. Y., Deshpande, P. B., & Mutalik, S. (2014). Gastroretentive Pulsatile Release Tablets of Lercanidipine HCl: Development, Statistical Optimization, and In Vitro and In Vivo Evaluation. *The Scientific World Journal*, 2014.
94. Rošic, R., Kocbek, P., Baumgartner, S., & Kristl, J. (2011). Electro-spun hydroxyethyl cellulose nanofibers: the relationship between structure and process. *Journal of drug delivery science and technology*, 21(3), 229-236.
95. Rošic, R., Kocbek, P., Pelipenko, J., Kristl, J., & Baumgartner, S. (2013). Nanofibers and their biomedical use. *Acta pharmaceutica*, 63(3), 295-304.
96. Rošic, R., Pelipenko, J., Kristl, J., Kocbeck, P., & Baumgartner, S. (2012). Properties, Engineering and Applications of Polymeric Nanofibers: Current Research and Future Advances. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 26(4), 417-425.
97. Sawada, T., Kondo, H., Nakashima, H., Sako, K., & Hayashi, M. (2004). Time-release compression-coated core tablet containing nifedipine for chronopharmacotherapy. *International journal of Pharmaceuticals*, 280(1-2), 103-111.

98. Sawada, T., Sako, K., Fukui, M., Yokohama, S., & Hayashi, M. (2003). A new index, the core erosion ratio, of compression-coated timed-release tablets predicts the bioavailability of acetaminophen. *International journal of pharmaceutics*, 265(1-2), 55-63.
99. Shamma, R. N., & Basha, M. (2013). Soluplus®: A novel polymeric solubilizer for optimization of Carvedilol solid dispersions: Formulation design and effect of method of preparation. *Powder technology*, 237, 406-414.
100. Shimpi, S. L., Mahadik, K. R., & Paradkar, A. R. (2009). Study on mechanism for amorphous drug stabilization using gelucire 50/13. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 57(9), 937-942.
101. Smallwood, I. (2012). *Handbook of organic solvent properties*. Butterworth-Heinemann.
102. Son, W. K., Youk, J. H., Lee, T. S., & Park, W. H. (2004). The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly (ethylene oxide) fibers. *polymer*, 45(9), 2959-2966.
103. Sridhar, R., Venugopal, J. R., Sundarrajan, S., Ravichandran, R., Ramalingam, B., & Ramakrishna, S. (2011). Electrospun nanofibers for pharmaceutical and medical applications. *Journal of drug delivery science and technology*, 21(6), 451-468.
104. Stefanis, E., & Panayiotou, C. (2008). Prediction of Hansen solubility parameters with a new group-contribution method. *International Journal of Thermophysics*, 29(2), 568-585.
105. Stefanis, E.; and Panayiotou, C. A new expanded solubility parameter approach. *Int. J. Pharm.*, 426(1), 29-43. (2012).
106. Teas, J. P. (1968). Graphic analysis of resin solubilities. *Journal of paint technology*, 40(516), 19-25.
107. Van den Mooter, G. (2012). The use of amorphous solid dispersions: A formulation strategy to overcome poor solubility and dissolution rate. *Drug Discovery Today: Technologies*, 9(2), e79-e85.
108. Van Leeuwen, J. F., Nauta, M. J., De Kaste, D., Odekerken-Rombouts, Y. M. C. F., Oldenhof, M. T., Vredendregt, M. J., & Barends, D. M. (2009). Risk analysis by FMEA as an element of analytical validation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 50(5), 1085-1087.
109. Vasconcelos, T., Sarmiento, B., & Costa, P. (2007). Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug discovery today*, 12(23-24), 1068-1075.
110. Verreck, G., Chun, I., Rosenblatt, J., Peeters, J., Van Dijck, A., Mensch, J., ... & Brewster, M. E. (2003). Incorporation of drugs in an amorphous state into electrospun nanofibers composed of a water-insoluble, nonbiodegradable polymer. *Journal of controlled release*, 92(3), 349-360.
111. Vo, C. L. N., Park, C., & Lee, B. J. (2013). Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85(3), 799-813.
112. Vora, C., Patadia, R., Mittal, K., & Mashru, R. (2013). Risk based approach for design and optimization of stomach specific delivery of rifampicin. *International journal of pharmaceutics*, 455(1), 169-181.
113. Wang, H. S., Fu, G. D., & Li, X. S. (2009). Functional polymeric nanofibers from electrospinning. *Recent patents on nanotechnology*, 3(1), 21-31.

114. Wannatong, L., Sirivat, A., & Supaphol, P. (2004). Effects of solvents on electrospun polymeric fibers: preliminary study on polystyrene. *Polymer International*, 53(11), 1851-1859.
115. Xie, L., Wu, H., Shen, M., Augsburger, L. L., Lyon, R. C., Khan, M. A., & Hoag, S. W. (2008). Quality-by-design (QbD): Effects of testing parameters and formulation variables on the segregation tendency of pharmaceutical powder measured by the ASTM D 6940-04 segregation tester. *Journal of pharmaceutical sciences*, 97(10), 4485-4497.
116. Youan, B. B. C. (2004). Chronopharmaceutics: gimmick or clinically relevant approach to drug delivery?. *Journal of Controlled Release*, 98(3), 337-353.
117. Yu, D. G., Branford-White, C., White, K., Li, X. L., & Zhu, L. M. (2010). Dissolution improvement of electrospun nanofiber-based solid dispersions for acetaminophen. *AAPS PharmSciTech*, 11(2), 809-817.
118. Yu, D. G., Zhu, L. M., White, K., & Branford-White, C. (2009). Electrospun nanofiber-based drug delivery systems. *Health*, 1(02), 67.
119. Zhang, K. H., Yu, Q. Z., & Mo, X. M. (2011). Fabrication and intermolecular interactions of silk fibroin/hydroxybutyl chitosan blended nanofibers. *International journal of molecular sciences*, 12(4), 2187-2199.

## 7.0 Biografija autora

Olivera Lavrič (devojački Kaljević) rođena je u Užicu, 20.11.1989. godine. Osnovnu i srednju školu završila je u Arilju. Farmaceutski fakultet u Beogradu upisala je 2008/09. godine, a diplomirala je 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,53 i ocenom 10 na završnom radu.

Doktorske akademske studije iz farmaceutske tehnologije na Farmaceutskom fakultetu upisala je školske 2013/2014. godine.

Od septembra do novembra 2013. godine radila je kao zamena za asistenta na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju. Od novembra 2013. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik na projektu TR34007 „Razvoj proizvoda i tehnologija koje obežbeđuju željeno oslobađanje lekovitih supstanci iz čvrstih farmaceutskih oblika” (rukovodilac projekta prof dr Svetlana Ibrić, period realizacije 2010-2016), finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Od jula 2016. do decembra 2017, radila je kao farmaceutski tehnolog u proizvodnji antibiotičkih čvrstih farmaceutskih oblika u Lek Pharmaceuticals, d.d. Ljubljana, Slovenija.

Olivera Lavrič (born Kaljević) was born in Uzice on November 20<sup>th</sup> 1989. She finished primary and high school in Arilje. She enrolled Faculty of Pharmacy in Belgrade in 2008/09 and graduated in 2013 with an average mark of 9.53 and a mark of 10 for her diploma thesis.

She started Doctoral Academic Studies in the field of Pharmaceutical Technology at the Faculty of Pharmacy in 2013/2014.

From September to November 2013 she worked as an assistant replacement at the Department of Pharmaceutical Technology and Cosmetology. Since November 2013 she has been employed as a research associate on the project TR34007 "Development of products and technologies that promises the desired release of solid substances from solid pharmaceutical forms" (project leader Prof. Svetlana Ibrić, project implementation period 2010-2016), financed by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia. From July 2016 to December 2017, she worked as a pharmaceutical technologist in the production of antibiotic solid pharmaceutical forms in Lek Pharmaceuticals, d.d. Ljubljana, Slovenia.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Оливера Лаврич

број уписа 07/13

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ФАРМАЦЕУТСКИ РАЗВОЈ ТАБЛЕТА СА ПУЛСНИМ ОСЛОБАЂАЊЕМ  
КАРВЕДИМОЛА ТЕХНИКАМА ЕЛЕКТРОПРЕЂЕЊА И ОБАНГАЊА КОМПРЕСИЈОМ

- 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, 06.06.2019.

Оливера Лаврич

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Оливера Лаврич

Број уписа 07/13

Студијски програм Докторске медицинске студије - Фармацеутска технологија

Наслов рада Фармацеутски развој таблета са пукним обрађивањем  
корецикла техником електроформирања и ослобађањем  
компресијом

Ментор Др сц. Светлана Ибрић, Др сц. Јелена Ђурчић

Потписани Оливера Лаврич

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, 06.06.2013

Оливера

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

ФАРМАЦЕУТИКИ РАЗВОЈ ТАБЛЕТА СА ЛУПСКИМ ОСНОВАЊЕМ  
КАРВЕДИЛОЛА ТЕХНИКАМ ЕЛЕКТРОПРЕДЕЉА И ОБРАТАКА ЕМПРЕСИЈОМ

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, 06.06.2019.

Малум