

İn Vitro Çözünme Hızı Çalışmalarında Yeni Yaklaşımlar

Duygu YILMAZ USTA*^o, Zeynep Şafak TEKSİN*

New approaches to in vitro dissolution rate studies

SUMMARY

The in vitro dissolution determines the quality and performance of the dosage form. The in vitro dissolution of the dosage form and the dissolution in biological fluids are the most important parameters affecting the absorption and bioavailability of the drug. The dissolution are evaluated in the reproducibility between the series, the post-approval formulation and the changes in the manufacturing process, and the biowaiver. Recently, biopharmaceutical evaluations based on Biopharmaceutical Classification System (BCS) related to dissolution rate and permeability as well as in vivo studies of drugs in vivo behavior, biorelevant media preferred in accordance with classical media, in silico approaches, simulations using pharmacokinetic models and in vitro in vivo correlations (IVIVC) have become very important. In this review, BCS-based sub-classification approaches for in vitro dissolution rate studies, the use of biorelevant media and biopharmaceutical evaluations based on simulation have been evaluated.

Key Words: In vitro dissolution, biorelevant media, simulation

İn vitro çözünme hızı çalışmalarında yeni yaklaşımlar

ÖZET

İn vitro çözünme hızı dozaj şeklinin kalitesini ve performansını belirler. Geliştirilen dozaj şeklinin in vitro çözünme hızı ve biyolojik sıvılardaki çözünmesi ilacın emilimini ve biyoyararlanımını etkileyen en önemli parametredir. Seriler arasındaki tekrarlanabilirlik, onay sonrası formülasyon ve üretim sürecindeki değişiklikler ve biyomuafiyette çözünme hızı değerlendirilmektedir. Son yıllarda, ilaçların in vivo davranışının belirlenmesinde, in vivo çalışmalar yanında çözünme hızı ve permeabiliteyle ilişkili Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemine (BCS) dayalı biyofarmasötik değerlendirmeler, biyoyumlu ortamların klasik ortamlara göre tercih edilmesi, in silico yaklaşımlar, farmakokinetik modellemeler kullanılarak yapılan simülasyonlar ve in vitro in vivo korelasyon (IVIVC) değerlendirmeleri oldukça önem kazanmıştır. Bu derlemede, in vitro çözünme hızı çalışmalarındaki BCS temelli alt sınıflandırma yaklaşımları, biyoyumlu ortamların kullanımı ve simülasyona dayalı biyofarmasötik değerlendirmeler incelenmiştir.

Anahtar kelimeler: İn vitro çözünme hızı, biyoyumlu ortamlar, simülasyon

Received: 12.12.2016

Revised: 27.12.2016

Accepted: 13.01.2017

*Farmasötik Teknoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 06330 Ankara, Türkiye

^o Corresponding Author:
Phone: 0312 202 30 52
Fax: 0312 212 79 58
E-mail: yilmazduyguusta@gazi.edu.tr

GİRİŞ

İn vitro çözünme hızı testleri, ilaç geliştirme sürecinde formülasyon faktörlerinin biyoyararlanıma etkisini tanımlamada kullanılan ilacın performansını ve kalitesini gösteren en önemli ölçüttür (Shah, 2005; Lobenberg & Amidon, 2000; FDA, 1997). Formülasyon geliştirmede, seriler arasındaki benzerliği ve üretimin devamlılığını sağlamak için in vitro çözünme hızı çalışmaları yapılmaktadır. Seriler arasındaki kalitenin sürdürülebilmesi, yeni formülasyon geliştirmede yol gösterici olması, üründe yapılması gereken formülasyon, üretim süreci, üretim yeri değişiklikleri ve ölçek büyütme gibi pek çok faktörün değerlendirilmesi için de önemlidir. Şekil 1'de in vitro çözünme hızı çalışmalarının kullanımı özetlenmektedir (Hayes et al., 2004; Storey, 1996; FDA, 1995).

Farmakope yöntemleri veya ürüne özgü geliştirilen çözünme hızı metotları, çözünme profillerinin anlamlı ve ayrıntılı değerlendirilmesini

garanti edebilmelidir. İn vitro çözünme hızı çalışmalarının temel amacı in vivo'daki dozaj şeklinin performansını tahmin etmektir. İn vivo davranışın tahmini bazen in vivo gastro intestinal koşulları en iyi yansıtan in vitro çözünme ortamlarının kullanımını gerektirmektedir. Bu amaçla açlık (Fasted State Simulating Intestinal Fluid-FaSSIF) ve tokluk (Fed State Simulating Intestinal Fluid-FeSSIF) gibi fizyolojik temelli biyoyumlu çözünme ortamları önerilse de bu ortamların yasal düzenlemelere girmesi için standardize çalışmalara ve değerlendirmelere gerek vardır (Klein, 2010; Jantratid et al., 2008; Galia et al., 1998). Gastro İntestinal Kanal (GIK) fizyolojisinin kompleksliği ve sindirim sürecinin değişkenliği bunun ana nedenlerinden bazılarıdır. Bu yetersizliklerin üstesinden gelenebilmesi için farklı ortamlar önerilmekte ve ortamların etkinliklerini ve in vivo'ya benzerliklerini artırma çalışmaları devam etmektedir (Ghazal et al., 2009; Jantratid et al., 2008; Lue et al., 2008; Fujioka et al., 2007; Sunesen et al., 2005).



Şekil 1. İn vitro çözünme hızı çalışmalarının kullanımı

Karşılaşılan problemlere daha rasyonel yaklaşılması ve in vivo'ya benzer daha doğru değerlendirmelerin yapılabilmesi için son çalışmalar doğrultusunda BCS alt sınıf değerlendirilmelerinin ve buna bağlı tahmini in vivo çözünme hızı yöntemlerinin, güncel biyoyumlu ortamların ve geliştirilen bilgisayar simülasyonlu değerlendirmelerin kullanılması gerekmektedir.

ÇÖZÜNME HIZI AÇISINDAN BCS ALT SINIF DEĞERLENDİRMELERİ: BCS Sınıf II A-B-C

1995 yılında Amidon ve arkadaşları tarafından etkin maddeleri çözünürlük ve permeabilite özellikleri ve dozaj şeklinin in vitro çözünme hızı temel alınarak gruplandırılan ve geliştirilecek olan yeni hızlı salımlı katı oral dozaj şekillerinin değerlendirilmesine olanak sağlayan BCS oluşturulmuştur (Amidon et al., 1995). Sistemin amacı, çözünürlük ve permeabilite ölçümleri ve in vitro çözünme hızı değerlendirmelerinden hareketle ilacın in vivo performansını tahmin etmek, in vitro çalışmaları artırıp, in vivo çalışmaları en aza indirmek, in vitro – in vivo korelasyonu (IVIVK) sağlamak ve biyoyararlanım/biyoeşdeğerlik (BY/BE) çalışmalarından biyomuafiyet kriterlerini belirlemektir. BCS değerlendirmeleri ilaç muafiyeti açısından ülkeler bazında paralellik göstermektedir (Tort et al., 2013; Sarısaltık & Teksin, 2012).

BCS Sınıf II (düşük çözünürlük, yüksek permeabilite) ve BCS Sınıf IV (düşük çözünürlük, düşük permeabilite) ilaçların in vitro çözünürlükleri ve in vivo'daki çözünme davranışları; asidik ve bazik yapı, formülasyon faktörleri ve in vivo lüminal çevreden dolayı oldukça değişkendir. Bu faktörler nedeni ile BCS Sınıf I (yüksek çözünürlük, yüksek permeabilite) ve BCS Sınıf III (yüksek çözünürlük, düşük permeabilite) için geçerli biyomuafiyet durumları, BCS Sınıf II ve BCS Sınıf IV ilaçların BCS değerlendirilmesinde geçerli değildir. BCS Sınıf II ve BCS Sınıf IV etkin madde/ilâç özellikleri ile BCS Sınıf II ve BCS Sınıf IV ilaçlar için alt sınıflandırma sistemi

oluşturulmuştur. Burada fizyolojik pH aralığındaki (pH < 7.5) ilacın asidik (a), bazik (b) veya nötral (c) özelliklerine bağlı olarak a (ibuprofen, ketoprofen), b (karvedilol, ketakonazol) ve c (fenofibrat ve danazol) olmak üzere alt sınıflara ayrılması önerilir (Tsume et al., 2014).

Sınıf IIa ilaçlar, açlık ve gastrik pH'da çözünmeyen ancak intestinal pH'da çözünen tipik olarak pKa'sı 4 ile 5 arasında olan (pKa ≤ 5.0) karboksilik asitlerdir. Flurbiprofen, ketoprofen, naproksen, rifampisin ve karbamazepin gibi pek çok BCS Sınıf IIa ilacın pH koşullarında düşük çözünürlüklü olmasına rağmen iyi oral absorpsiyon gösterdiği bilinmektedir. Usta Yılmaz ve arkadaşları tarafından bu alt sınıflandırma temel alınarak Türk ilaç pazarında flurbiprofen etkin maddesini içeren inovatör ve beş eşdeğer ürünün çözünme profilleri karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir (Usta Yılmaz et al., 2015). Yine bu alt sınıflandırma temel alınarak Türk ilaç pazarında ibuprofen etkin maddesini içeren inovatör ve iki eşdeğerin çözünme profilleri Yaşın Sarısaltık ve arkadaşları tarafından karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (Yaşın Sarısaltık et al., 2015). Sonuç olarak BCS Sınıf IIa zayıf asidik ilaçların, özellikle ibuprofen, flurbiprofen gibi küçük molekülü nonsteroidal anti-inflamatuar ilaçların (NSAIDs), gastrik pH'da düşük çözünürlük göstermesine rağmen ince bağırsakta hızlı çözüldüğü ve BCS Sınıf I ilaçlar gibi davrandığı gözlemlenmiştir ve bu nedenle de biyomuafiyete sahip olabileceği düşünülmektedir. Bu yaklaşım WHO'nun kılavuzlarında ve FIP'in biyomuafiyet değerlendirilmelerinde öneri olarak yer almakla birlikte henüz FDA ve EMA yasal düzenlemelerine girememiştir.

BCS Sınıf IIb bazik ilaçlar ise midedeki asidik pH'da yüksek çözünürlük ve çözünme hızı gösterirken ince bağırsakta çökebilirler. Sınıf IIb ilaçların bağırsakta çökmesinin formülasyon, GI fizyolojik faktörler (lüminal bileşim) ve dozlama zamanındaki

Tablo1. İlaçların BCS alt sınıflandırmasını temel alan çözünürlük ve permeabilite özellikleri (Tsume et al., 2014).

BCS alt sınıflandırması	pH 2.0'deki çözünürlük	pH 6.5'deki çözünürlük	Permeabilite
I	Yüksek	Yüksek	Yüksek
IIa ^a	Düşük	Yüksek	Yüksek
IIb ^b	Yüksek	Düşük	Yüksek
IIc ^c	Düşük	Düşük	Yüksek
III	Yüksek	Yüksek	Düşük
IVa ^a	Düşük	Yüksek	Düşük
IVb ^b	Yüksek	Düşük	Düşük
IVc ^c	Düşük	Düşük	Düşük

çevresel ortama bağlı olabileceği düşünülmektedir (Tsume et al., 2014).

Sınıf IIc ilaçların çözünürlüğü ise in vivo pH değişikliklerinden etkilenmemekle birlikte, in vivo ortam etkenleri olan sürfaktanlar ve lipitler çözünme üzerinde önemli olup etkilerinin tahmin edilmesi güçtür.

Bütün bunlar dikkate alındığında, BCS Sınıf II ilaçların, formülasyonları, GI çözünürlük, çözünme hızı ve in vivo oral absorpsiyon ve biyoyararlanımının BCS alt sınıflandırması kapsamında değerlendirilmesi kritik öneme sahiptir.

Tahmini İn Vivo Çözünme Yöntemlerinin Kestirimi

BCS için önerilen alt sınıflandırma; ilaç etkin maddelerini ve dozaj şeklini ortalama açlık insan mide sıvılarının özelliğine ve ince bağırsaktaki göreceli çözünürlüklerine göre ayırmaktadır. İn vivo permeasyon ve çözünürlük hakkındaki bazı genellemeler bu göreceli çözünürlüğe göre yapılabilir. Böylece in vivo çözünme tahmin yöntemi ve IVIVC geliştirilmesinde bir başlangıç noktası olarak kullanılması söz konusu olabilir. En uygun yöntemin dikkatli seçimi ancak partikül büyüklüğü ve dağılımı, doz, GIK'ın farklı segmentlerdeki permeasyon hızı, fiziksel form, çözünme hızı gibi etkin maddenin ve ilaç ürünün özelliklerinin değerlendirilmesinden sonra gerçekleştirilebilir. Ayrıca açlık ve tokluk koşullarında da değerlendirmeler yapılarak, alınan gıdanın içeriği ve yağ oranı da göz önüne alınmalıdır. Diyabet, aklorihidri gibi çeşitli hastalıklar nedeniyle ve ilaç-ilaç etkileşimleri aracılığıyla gastrointestinal fizyolojinin değişim gösterebileceği de unutulmamalıdır (Dressman & Reppas, 2000).

İN vivo tahminde çözünme yöntemleri farmakope yöntemlerinden daha kapsamlı olarak geliştirilerek valide edildiğinde; ürün geliştirilmesinde, tip değişikliklerinde ve ürün performans özelliklerinin kalite ile tasarım kullanılarak saptanmasındaki yaklaşımlar yeni ilaçların geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir.

GÜNCEL BİYOYUMLU ORTAMLAR

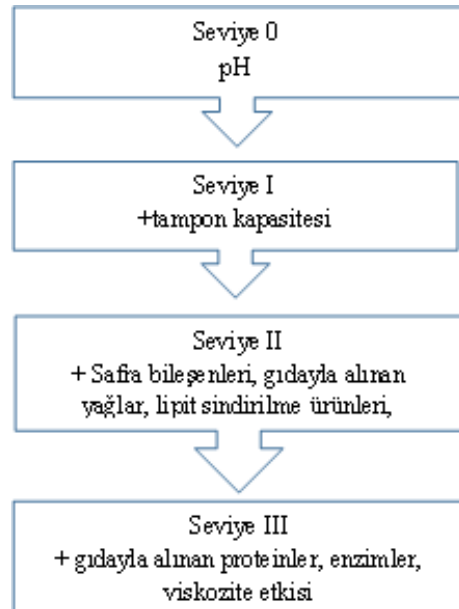
Dozaj formunun biyofarmasötik performansının belirlenmesi için çözünme hızı kullanıldığı zaman, tasarlanan testin GI kanalı iyi taklit etmesi salım için gerekli olan sink koşulun sağlanmasından daha önemlidir (FIP, 1997). İlaç ürününün biyofarmasötik yönünün izlenerek seriden seriye kontrolün garantilenmesi için tek çözünme hızı testinin geliştirilmesi veya tek çözünme ortamının seçilmesi kimi zaman yeterli değildir. Farklı etkin maddelerle farklı ortamlarda yapılmış pek çok çalışma, in vivo çözünürlük ve çözünme hızının tahmininde in vivo en yakın olanın değerlendirilmesinde biyoyumlu ortamların kullanılmasının önemini belirtmektedir. Özellikle BCS Sınıf II ilaçlar için klasik farmakope in vitro çözünme ortamlarının yerine biyoyumlu

ortamların kullanılması daha iyi sonuç vermektedir (Bayka et al., 2013; Teksin, September 2011; Teksin, June 2011).

Oral formülasyonların çözünme hızı özellikleri, düşük çözünürlüklü ilaçlar için öncelikle fizyolojik pH aralığı olan 1.2-6.8'de (modifiye salımlı formülasyonlar için pH 1.2-7.5) değerlendirilmelidir. Rutin test için en uygun çözünme ortamı ve yöntem seçildikten sonra profil değerlendirilmeleri yapılmaktadır.

Bazı düşük çözünürlüklü ilaçların, sulu çözeltileri fizyolojik pH aralığında yeterli çözünmez. Bu bileşikler için, genellikle % 3'e kadar sürfaktan içeren bir çözünme ortamı ilacın çözünürlüğünün artması ve sink koşulun garantilenmesi için kullanılabilir (Shah et al., 1995). Ancak, insan GIK'ı böyle bir yüksek sürfaktan konsantrasyonuna sahip değildir ve bu nedenle yüksek sürfaktan içeren ortamlardan elde edilen çözünme hızı sonuçlarının biyoyararlanım ile zayıf korelasyona sahip olması olağan bir sonuçtur. Kullanılacak sürfaktanlar ve konsantrasyonları dikkatli seçilerek gerekçelendirilmelidir. Genel olarak, non-iyonik yapıda olan sürfaktanlar biyolojik yapı ile ilişkili olması nedeniyle kullanımda ilk seçenek olarak tercih edilmektedir.

İN vitro test koşulları, GIK'a yakın olduğunda dozaj formunun intralüminal performansı için daha iyi bir tahmin şansı sağlarken, etkin maddenin ve dozaj formunun özellikleri de lüminal şartların simülasyonunda istenen seviyeyi sağlayacaktır. Dressman ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada lüminal içeriğin simülasyonu dört seviyeye ayrılmıştır (Şekil 2) (Markopoulos et al., 2015).



Şekil 2. Oral formülasyonların geliştirilmesi sırasında lüminal çevrenin taklit etmesi için dört seviyeden oluşan biyoyumlu ortam önerisi (Markopoulos et al., 2015)

Seviye 0 Biyoyumlu Ortam

Bu seviyede, dozlama koşulları dikkate alınmaksızın, distile veya saflaştırılmış su veya normal GI pH aralığında bir pH değerine sahip olan tampon sistemi ile yalnızca lüminal pH taklit edilmiştir.

Bu ortamlar, Geliştirme Sınıflandırma Sistemi (Development Classification System-DCS) Sınıf I ve II etkin maddeler, hızlı salım ürünler için çözünme hızı deneylerinde farmakope çözünme hızı aparatları ve pH 1.2, pH 4.5 ve pH 6.8 tamponlarının kullanılarak, dozun çözünmesinin gastrik boşalma hızından büyük olup olmadığının klasik değerlendirilmesinde ve bazı ER ürünlerin bulunduğu DCS Sınıf I ve III etkin maddeler için IVIVC modeli geliştirilmesinde yararlı olabilmektedir (WHO, 2012; Butler & Dressman, 2010; EMA, 2010; FDA, 2000).

Seviye I Biyoyumlu Ortam

Bu seviyede, açlık ve tokluk durumları arasında bir ayırım yapılırken her bir dozlama koşulu için tampon kapasitesi ve lüminal pH simüle edilmiştir.

Tablo 2'de, Seviye I biyoyumlu ortam simülasyonu için açlık durumu altındaki GI lümenin değişik bölgelerinin koşulları gösterilmiştir. Seviye I Açlık Durumunu Taklit Eden Mide Sıvısının (Fasted State Simulating Gastric Fluid - Seviye I FaSSGF), Seviye I Açlık Durumunu Taklit Eden Bağırsak Sıvısının (Fasted State Simulating Intestinal Fluid - Seviye I FaSSIF ve Seviye I FaSSIF-V2) ve Seviye I Açlık Durumunu Taklit Eden Kolonik Sıvısının (Fasted State Simulating Colonic Fluid - Seviye I FaSSCoF) bileşimleri daha önceki önerilen insan verilerine dayandırılmıştır. İnce bağırsağın orta-üst ve/veya alt kısımlarının tampon kapasitesi verileri, açlık

durumunda yetişkinlerin çıkan kolon ve üst ince bağırsağın tampon kapasitesi ve pH'larının ölçülüp ve literatür verileriyle birlikte kestirimi ile orta-üst Seviye I Açlık Durumundaki İntestinal Sıvı (Fasted State Simulating Intestinal Fluid midgut - Seviye I FaSSIF_{ortabağırsak}) ve ileum Seviye I Açlık Durumundaki İntestinal Sıvıdan (Simulated Intestinal Fluid in the ileum - Seviye I SIF_{ileum}) elde edilmiştir (Vertzoni et al., 2010; Vertzoni et al., 2005; Vertzoni et al., 2004).

Seviye I biyoyumlu ortamın simülasyonu için, gıda alımından sonraki midede değişen süreçler ve tokluk durumundaki intestinal lümenin değişik bölgelerindeki koşullar sırasıyla Tablo 3 ve Tablo 4'te verilmiştir.

Seviye I FeSSGF_{ilk}, Seviye I FeSSGF_{orta} ve Seviye I FeSSGF_{son} olarak tokluk durumunda üç farklı zaman periyodu boyunca, ilk, alımdan 75 dakikaya kadar; orta, 75-165 dakika ve son 165. dakikadan sonra, intragastrik pH ve tampon kapasitesini simüle etmek üzere ayrılmıştır. Çeşitli Seviye I FeSSGF'lerin bileşimleri Seviye I Tokluk Durumunu Taklit Eden İntestinal Sıvı (Fed State Simulating Intestinal Fluid - Seviye I FeSSIF veya FeSSIF-V2) ve Seviye I Tokluk Durumunu Taklit Eden Kolonik Sıvı (Fed State Simulating Colonic Fluid - Seviye I FeSSCoF) daha önce insanlardan elde edilen lüminal verilere dayanmakta iken orta-üst kısımdaki Seviye I Tokluk Durumunu Taklit Eden İntestinal Sıvı (Fed State Simulating Intestinal Fluid midgut - Seviye I FeSSIF_{ortabağ}) ve ileumdaki Seviye I Tokluk Durumunu Taklit Eden İntestinal Sıvı (Simulated Intestinal Fluid in the ileum - Seviye I SIF_{ileum}) bileşimleri ilk kez önerilmiştir (Tablo 4). Alt ince bağırsağın şu anda ulaşılabilir bir tampon kapasitesi verisi olmadığı

Tablo 2. Açlık durumundaki midenin, üst/orta/alt ince bağırsağın ve çıkan kolon çevresinin simülasyonu için Seviye I biyoyumlu ortamın fizikokimyasal özellikleri ve bileşimi (Markopoulos et al., 2015)

	Seviye I FaSSGF	Seviye I FaSSIF	Seviye I FaSSIF-V2	Seviye I FaSSIF _{ortabağırsak}	Seviye I SIF _{ileum}	Seviye I FaSSCoF
HCl	qs pH 1.6	-	-	-	-	-
Tris (mM)	-	-	-	-	-	45.4
Maleik asit (mM)	-	-	19.1	19.3	52.8	75.8
NaOH (mM)	-	13.8	34.8	36.5	105	120
Potasyum dihidrojen fosfat (mM)	-	28.7	-	-	-	-
HCl Tampon kapasitesi [(mmol/L)/ΔpH]	n.a.*	12	10	10	10	16
pH	1.6	6.5	6.5	6.8	7.5	7.8

*n.a., uygulanamaz

Tablo 3. Tokluk durumunda midedeki ortamın simülasyonu için Seviye I biyoyoumlu ortamın fizikokimyasal özellikleri ve bileşimi (Markopoulos et al., 2015)

	Seviye I FeSSGF _{ilk}	Seviye I FeSSGF _{orta}	Seviye I FeSSGF _{son}
Maleik asit (mM)	40.78		
Asetik asit (mM)	–	18.31	–
Sodyum asetat (mM)	–	32.98	–
Orto-fosforik asit (mM)	–	–	5.5
Sodyum dihidrojen fosfat (mM)	–	–	32
HCl/NaOH	qs pH 6.4	qs pH 5	qs pH 3
HCl Tampon kapasitesi [(mmol/L)/ΔpH]	21.33	25	25
pH	6.4	5	3

Tablo 4. Tokluk durumundaki üst/orta/alt ince bağırsağın ve çıkan kolon çevresinin simülasyonu için Seviye I biyoyoumlu ortamın fizikokimyasal özellikleri ve bileşimi (Markopoulos et al., 2015)

	Seviye I FeSSIF	Seviye I FeSSIF-V2	Seviye I FeSSIF _{ortabağırsak}	Seviye I SIF _{ileum}	Seviye I FeSSCoF
Tris (mM)	–	–	–	–	30.5
Maleik asit (mM)	–	71.9	46.5	52.8	30.15
NaOH (mM)	101	102.4	83	105	16.5
Asetik asit (mM)	144	–	–	–	–
HCl Tampon kapasitesi [(mmol/L)/ΔpH]	76	25	25	10	15
pH	5.0	5.8	6.5	7.5	6.0

için, bileşim tokluk durumundaki yetişkinlerde ince bağırsağın üst kısmında ve çıkan kolonda daha önceden ölçülen pH ve tampon kapasitesi temel alınarak literatürdeki pH verilerinin kombine edilmesiyle elde edilmiştir.

Seviye I biyoyoumlu ortam (Tablo 2-4) DCS Sınıf I ve III dozaj formlarının lüminal performansının ve pH ilişkili potansiyel gıda etkisinin değerlendirilmesi için yararlıdır. Yüksek çözünürlüklü ilaçlar için çözünme hızı sonuçlarının elde edilmesinde safra tuzları ve lipitleri içeren bu ortamların kullanımı gerekli değildir. Salımı lüminal pH ve tampon kapasitesinden etkilenen ER ürünlerde yer alan DCS Sınıf I ve III etkin maddeler için, Seviye I biyoyoumlu ortam IVIVC modeller geliştirilmesinde kullanılabilir. DCS sınıflandırması ne olursa olsun, özellikle Seviye I FeSSGF'ler, konvansiyonel hızlı salım dozaj formları gıda alımı öncesinde yani açlık durumunda verildiğinde ve/veya yemeğin sulu fazı ile dağıldığında ve boşaldığı zaman anlamlıdır. Ancak özellikle tokluk durumu için, in vivo in vitro ilişkinin (IVIVR) geliştirilmesinde Seviye I ortamın kullanımını doğrulamak için daha detaylı değerlendirmelere ihtiyaç vardır.

Seviye I biyoyoumlu ortam bileşimi ile ilişkili diğer konular, orta-üst ve ileumdaki tampon kapasitesi hakkında doğrudan ulaşılabilecek verilerin bulunmaması özellikle tokluk durumunda bağırsakta istenen pH ve tampon kapasitesi ulaşmak için kullanılacak uygun tampon materyallerinin doğru seçimini içerir.

Gıdaların sindirim ve absorpsiyonu bağırsağın ilk yarısında neredeyse tamamlanmakta iken, ileal lümen ortamının besin alımı üzerinde az bir etkiye sahip olduğu kabul edilir. Bu nedenle ileal ortamı taklit etmek için dozlama koşullarından bağımsız tek bir ortam (Seviye I SIF_{ileum}, Tablo 2 ve 4) önerilmektedir.

Uygun tampon türlerinin seçimi ile ilgili olarak, açlık ve tokluk koşulları altında üst ve alt bağırsaktaki tampon kapasitesi ve pH'nın simüle edilmesi için tek bir tampon sistemi kullanmak birincil öneme sahiptir. Maleatlar ilişkili tüm pH'larda istenen uygun tampon kapasitelerinin elde edilmesinde uygundur (Tablo 2 ve Tablo 4). Seviye I FaSSIF'deki fosfatlar bikarbonat ile karşılaştırıldığında kolona hedeflenen ilaçlarda kullanılan polimerlerin hızlı çözünmesine yol açabilir. Fizyolojik olarak, açlık koşullarının taklit edilmesi için bikarbonatların kullanımının daha uygun olacağı belirtilmektedir.

Seviye II Biyoyumlu Ortam

Bu seviyede, lüminal pH, tampon kapasitesi, osmolalite, dozlama koşulları bölgeye göre değişen safra bileşenlerinin varlığı, gıdayla alınan lipitler ve ilgili sindirim ürünleri simüle edilmektedir (Şekil 2).

Açlık koşullarında GIK'ın çeşitli bölge koşullarının simüle edilmesi için Seviye II biyoyumlu ortam Tablo 5'te gösterilmiştir. Seviye II Açlık Durumunu Taklit Eden Gastrik Sıvının (Fasted State Simulating Gastric Fluid – Seviye II FaSSGF) ve Seviye II Açlık Durumunu Taklit Eden İntestinal Sıvının (Fasted State Simulating Intestinal Fluid – Seviye II FaSSIF

veya FaSSIF-V2) bileşimleri daha önceki önerilen insan lüminal verilerine dayanmaktadır. Bağırsağın orta kısmında Seviye II Açlık Durumunu Taklit Eden İntestinal Sıvı ve ileumda Seviye II Açlık Durumunu Taklit Eden İntestinal Sıvı ilk kez önerilmiştir (Tablo 5). Bu içerikler literatürdeki sınırlı verilere ve yetişkinlerde açlık durumundaki bağırsağın üst kısmında ve çıkan kolonda ölçülen lesitin, safra tuzu ve osmolalite verisine dayanmaktadır. Seviye II Açlık Durumunu Taklit Eden Kolonik Sıvı (Fasted State Simulating Colonic Fluid - Seviye II FaSSCoF), sodyum taurokolat yerine sodyum kolat içermektedir.

Tablo 5: Açlık durumundaki midede, üst/orta/alt ince bağırsağın ve çıkan kolon çevresinin simülasyonu için Seviye II biyoyumlu ortamın fizikokimyasal özellikleri ve bileşimi (Markopoulos et al., 2015)

	Seviye II FaSSGF	Seviye II FaSSIF	Seviye II FaSSIF-V2	Seviye II FaSSIF _{ortaiüst}	Seviye II SIF _{ileum}	Seviye II FaSSCoF
Sodyum taurokolat (mM)	0.08	3	3	1.5	0.8	–
Sodyum kolat (mM)	–	–	–	–	–	0.15
Lesitin (mM)	0.02	0.75	0.2	0.1	0.2	0.3
Sodyum oleat (mM)	–	–	–	–	–	0.1
Tris (mM)	–	–	–	–	–	45.4
Maleik asit (mM)	–	–	19.1	19.3	52.8	75.8
Potasyum dihidrojen fosfat (mM)	–	28.7	–	–	–	–
NaOH (mM)	–	13.8	34.8	36.5	105	120
HCl	qs pH 1.6	–	–	–	–	–
Sodyum klorür (mM)	34.2	–	68.6	76.1	30.1	–
Osmolalite (mOsm/kg)	121	270	180	190	190	196
HCl Tampon kapasitesi [(mmol/L)/ΔpH]	n.a.*	12	10	10	10	16
pH	1.6	6.5	6.5	6.8	7.5	7.8

*n.a., uygulanamaz

Seviye II ortamı, midedeki tokluk koşullarında çeşitli ortam koşullarının ve tokluk durumundaki intestinal lümenin değişik bölgelerindeki koşullarının simüle edilmesi için Tablo 6 ve 7'de gösterilmiştir. Tokluk durumunda Seviye I FeSSGF'ler, Seviye II FeSSGF_{ilk}, Seviye II FeSSGF_{orta} ve Seviye II FeSSGF_{son} olarak gıda alındıktan sonra üç farklı zaman periyodu boyunca, erken; alımdan 75 dakikaya kadar, orta; 75-165 dakika ve geç; 165. dakikadan sonra, intragastrik

koşulları simüle etmek için önerilmiştir. Çeşitli Seviye II FeSSGF (Tablo 5) içerikleri Lipofundin MCT 20 (Braun Melsungen, Melsungen, Almanya) ilave edilmiş Seviye I FeSSGF'e dayanmaktadır. Lipofundin MCT 20, tokluk durumunda insan midesinde gözlenen lipit içeriğine benzer miktarda lipit içeren y/s emülsiyonu parenteral bir besindir (Vertzoni et al., 2012; Armand et al., 1994).

Tablo 6: Tokluk durumundaki mide ortamının simülasyonu için Seviye II biyoyumlu ortamın fizikokimyasal özellikleri ve bileşimi (Markopoulos et al., 2015)

	Seviye II FeSSGF _{ilk}	Seviye II FeSSGF _{orta}	Seviye II FeSSGF _{son}
Maleik asit (mM)	47.0	–	–
Asetik asit (mM)	–	18.31	–
Sodyum asetat (mM)	–	32.98	–
Orto-fosforik asit (mM)	–	–	5.5
Sodyum dihidrojen fosfat (mM)	–	–	32
Lipofundin/tampon	17.5 : 82.5	8.75 : 91.25	4.375 : 95.625
HCl/NaOH	qs pH 6.4	qs pH 5	qs pH 3
Sodyum klorür (mM)	270.1	181.7	127.5
Osmolalite (mOsm/kg)	559	400	300
HCl Tampon kapasitesi [(mmol/L)/ΔpH]	21	25	25
pH	6.4	5	3

Tablo 7: Tokluk durumundaki üst/orta/alt ince bağırsağın ve çıkan kolon çevresinin simülasyonu için Seviye II biyoyumlu ortamın fizikokimyasal özellikleri ve bileşimi (Markopoulos et al., 2015)

	Seviye II FeSSIF	Seviye II FeSSIF-V2	Seviye II FeSSIF _{ortabağırsak}	Seviye II SIF _{ileum}	Seviye II FeSSCoF
Sodyum taurokolat (mM)	15	10	5	0.8	–
Sodyum kolat (mM)	–	–	–	–	0.6
Lesitin (mM)	3.75	2	1	0.2	0.5
Gliseril monooleat (mM)	–	5	2.5	–	–
Sodyum oleat (mM)	–	0.8	0.4	–	0.2
Glukoz (mg/mL)	–	–	–	–	14
Tris (mM)	–	–	–	–	30.5
Maleik asit (mM)	–	71.9	46.5	52.8	30.15
Asetik asit (mM)	144	–	–	–	–
NaOH (mM)	101	102.4	83	105	16.5
Sodyum klorür (mM)	–	125.5	102.6	30.1	34
Potasyum klorür (mM)	204	–	–	–	–
Osmolalite (mOsm/kg)	635	390	300	190	207
HCl Tampon kapasitesi [(mmol/L)/ΔpH]	76	25	25	10	15
pH	5.0	5.8	6.5	7.5	6.0

Seviye II Tokluk Durumunu Taklit Eden İntestinal Sıvı (Fed State Simulating Intestinal Fluid - Seviye II FeSSIF veya FeSSIF-V2) bileşimi daha önce önerilen insan ilişkili lüminal verilere dayanmaktadır. Bağırsağın orta kısmında Seviye II Tokluk Durumunu Taklit Eden İntestinal Sıvı (Fed State Simulating Intestinal Fluid - Seviye II FeSSIF_{ortabağırsak}) ve ileumda Seviye II Tokluk Durumunu Taklit Eden İntestinal Sıvı (Fed State Simulating Intestinal Fluid - Seviye II SIF_{ileum}) ilk kez önerilmiştir (Tablo 7). Alt ince bağırsağın lesitin verileri ulaşılabilir olmadığından, tok yetişkinlerin çıkan kolon ve ince bağırsağın üst

kısımındaki safra tuzu, lesitin ve osmolalitenin önceden ölçülmesine ve safra tuzları ve osmolalite için literatür verisi ile kombine edilmesine dayandırılmıştır. Seviye II Tokluk Durumunu Taklit Eden Kolonik Sıvı, Seviye II FaSSCoF gibi küçük değişikliklerle oluşturulmuştur (Tablo 5, Tablo 7).

İnce bağırsak, mide ve kolonun açlık ve tokluk koşulların taklit edilebilmesinde biyoyumlu ortamların hazırlanması ticari ürünlerin kullanımı ile kolaylaşmıştır. Mevcut bu ticari ürünlerin kullanımı ile günler arası, özellikle Seviye II ortamdaki koloidal partiküllerin partikül büyüklüğü dağılımının

değişkenliğinin azaltılması ve böylelikle in vitro test sonuçlarındaki değişkenliği azaltılması beklenmektedir. Bu amaçla Biorelevant firması FaSSIF, FeSSIF, FaSSGF, FaSSIF-V2, FeSSIF-V2, FaSSCoF, FeSSCoF ortamlarını taklit edebilen karışımları kullanıma sunmuştur. FeSSGF'de 2017 yılında kullanıma sunulmak üzere firmanın ürün portföyü içinde yerini almıştır (biorelevant.com, 2016).

Seviye II ortam DCS Sınıf II ve IV dozaj formlarının lüminal performansının değerlendirilmesi için yararlı olmakla birlikte bu ortamdan elde edilen ilişkili veri daha sonra fizyolojik temelli farmakokinetiğe (physiologically based pharmacokinetic - PBPK) entegre edilebilir. Bununla birlikte Seviye II ortam salımının lüminal şartlar ile etkilendiği bilinen MR ürünlerin PBPK modellemesi için de yararlı olabilir.

Seviye I ortam olduğu gibi, ilişkili Seviye II ortam içeriğinin ileal bileşimin dozajlama koşulları ile etkilenip etkilenmediği sorusunu içerir (Seviye II SIF_{ileum}, Tablo 4). Bu tür bileşenlerin önemi doğrulanana kadar, Seviye II FaSSIF yerine Seviye II FaSSIF-V2 ile lüminal süreçlerin değerlendirilmesinde dikkatli olunmalıdır.

Seviye III Biyoyumlu Ortam

Bu seviyede, lüminal osmolalite, pH, tampon kapasitesi, safra bileşenleri, gıdayla alınan lipit bileşenleri, gıdayla alınan proteinler ve artan viskozite (özellikle tokluk durumunda midede ve bağırsağın alt kısmında) üst GI lümenindeki sindirim süreçleri simüle edilir (Şekil 2). Sindirim genellikle tokluk koşulları anlamına gelir, ancak lüminal parçalanmaya yatkın bazı etkin maddelerin ve lipit bazlı formülasyonların sindirimi bazen açlık koşullarında da meydana gelebilir. Buna ek olarak, in vitro simülasyon tipi ve GI sistem hareketleri iyi belirlenemeyen belirli MR dozaj formları için, viskozite dikkate alınmalıdır.

Tokluk durumunda midede artan viskozite sindirim açısından önemli olup dozaj formunun

performansı üzerinde bir etkiye sahiptir ve viskozite pektin ve hidroksipropilselüloz kullanılarak taklit edilir (Cvijić et al., 2014; Radwan et al., 2014; Klein et al., 2004). Tokluk durumunda midenin viskozitesi, bağırsağın üst kısmında permeabilitesi sınırlı olan ilaçların oral absorpsiyonu için çok önemlidir.

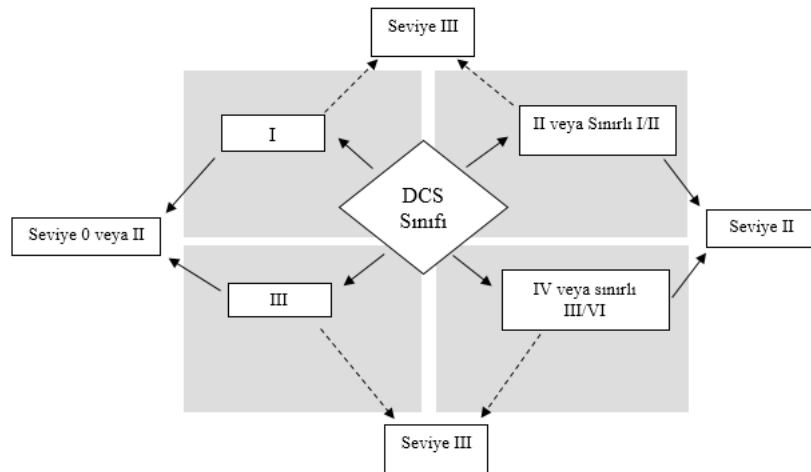
Gıdayla alınan lipitler ile proteinlerin yokluğu, belirli durumlarda tokluk boyunca intragastrik sindirimin gösterilmesi için önemlidir. Buna ek olarak, bağırsak ortamındaki etkin maddelerin çözünürlüğü değerlendirileceği zaman proteinleri içermesi önemli olabilir, ancak in vitro deneyler için uygun proteinlerin tanımlanması yeterli lüminal verinin olmamasından dolayı değerlendirilmesi oldukça sınırlıdır.

Tokluk durumundaki sindirim değişik yaklaşımlar kullanılarak taklit edilmektedir. Bunlardan bazıları, in vivo çalışmalarda midedeki motilite durumunun taklit edilmesi sağlayan gerçek yemeklerin kullanımı iken diğer yaklaşım diyetle alınan proteinlerin ve lipitlerin eksikliğinde UHT inek sütünün ortam olarak simülasyon için kullanılmasıdır.

Seviye III biyoyumlu ortamın özellikle bazı lipit bazlı formülasyonların (Lipit Formülasyon Sınıflandırma Sistemi Tip I, II ve IIIa) ve hem etkin madde hem de dozaj formunun lüminal stabilite özelliklerinin değerlendirilmesi için yararlı olabileceği de belirtilmektedir.

BİYOYUMLU ORTAMLARIN FARKLI SEVİYELERİ İÇİN KARAR AĞACI UYGULAMASI

Bir önceki bölümde de belirtildiği üzere etkin madde ve dozaj formunun spesifik kombinasyonuna göre, lüminal koşulların çeşitli seviyelerde taklit edilmesinin uygun olacağı düşünülmektedir. Eldeki bilgilerden hareketle oluşturulan karar ağacı kullanımı ile uygun simülasyon seviyesinin seçimi kolaylaşmaktadır (Şekil 3) (Markopoulos et al., 2015).



Şekil 3. Oral olarak verilmiş ilaçların in vitro lüminal performansının değerlendirilmesinde lüminal koşulların simülasyonu için uygun seviyenin seçilmesinde etkin maddenin DCS sınıflandırmasına göre karar ağacı. Belirli durumlarda gri renkli bölge Seviye III biyoyumlu ortam kullanımı yararlı olabilir ancak genel olarak rutin formülasyon taramaları için önerilmez (Markopoulos et al., 2015).

BİLGİSAYAR SİMÜLASYONLARIYLA FARMASÖTİK DEĞERLENDİRMELER

Bir oral dozaj formunun in vivo performansını etkileyen pek çok faktör bulunmaktadır ve bu in vivo performansın doğru olarak tahmin edilebilmesi ilaç geliştirilmesi açısından çok önemlidir. Temel amaç ise hem masraflı hem de etik olarak tartışmalı hayvan ve insan deneylerinin çeşitli yaklaşımlarla azaltılmasını sağlamak ve bu yeni yaklaşımlarla biyomuafiyet değerlendirmelerini oluşturmaktadır (Jones et al., 2009; Dokoumetzidis et al., 2007). Son yıllarda bu amaçla ilaç alanında da uygulanan bilgisayar ve simülasyon programlarıyla in vivo kestirimler oldukça önem kazanmıştır.

1998 yılında, mide-bağırsak kanalını ayrıntılı olarak tanımlayan ve PBPK yaklaşımını uygulayan ilk ticari yazılım olan GastroPlus™ Simulations Plus tarafından geliştirilmiştir ve bu yazılımla, etkin maddenin sudaki çözünürlüğü ve farmakokinetik özellikleri göz önüne alınarak ilacın mide-bağırsak kanalındaki hareketi, birbirine seri kompartümanlar aracılığıyla simüle edilmiştir. Bu verilerle, ilacın biyoyararlanımında emilim veya çözünürlük/çözünme hızının etkili olacağı belirlenebilmiştir (Pang & Durk, 2010).

Günümüzde pek çok simülasyon programı olmakla birlikte, burada sadece çözünme hızı üzerine yoğunlaşmış olan iki program aşağıda değerlendirilmiştir:

DDDPlus™

Simulations Plus firması tarafından, çeşitli koşullar altında formülasyonlardaki etkin maddelerin ve yardımcı maddelerin çözünürlüklerini ve in vitro çözümlerini simüle etmek için geliştirilmiş FDA tarafından da onaylanmış bir bilgisayar programıdır (simulations-plus.com, 2016).

Beş farklı dozaj formu (toz, kapsül, tablet, şişebilen polimer matriks, şişmeyen polimer matriks) için uygulanmaktadır. USP Palet, USP Sepet, Dönen Disk, USP Sürekli Akış Hücresi olmak üzere 4 USP Deneysel Aparatı vardır. Çözünürlük için 5 matematiksel model; kütle transferi, Nerst-Brunner, intrinsik çözünürlük, Johnson-Silindirik, Johnson-Küresel üzerinden çıktı vermektedir. Kritik çözünme parametreleri olarak; partikül büyüklüğü dağılımı, yardımcı madde miktarı, çözünme ortamı ve sürfaktanlar, matriks çapı gibi faktörleri girdi olarak kabul etmektedir. Ayrıca referans bir profil yüklendikten sonra, simülasyon sonuçları ile FDA'nın de öngördüğü şekilde f_1 ve f_2 değerlendirilmesi yapılabilmektedir.

DDSolver®

DDSolver®, çözünme hızı profillerinin karşılaştırılması, modelleme ve hesaplamaların basitleştirilme-

si amacıyla ücretsiz olarak ulaşılabilen ve kolay kullanım avantajı sağlayan Microsoft Excel için Visual Basic ile yazılmış menü yönlendirmeli ilk bilgisayar temelli programdır (Yong et al., 2010). Programla amaçlanan; çözünme hızı verileri arasındaki benzerliğin değerlendirilmesini kolaylaştırmak, nonlineer optimizasyon metodu kullanılarak çözünme hızı verilerine uyan model bir veri kütüphanesi oluşturmak ve çözünme hızı profillerinin karşılaştırılabilmesini sağlamaktır.

Program içinde kolay ulaşılabılır, hazır bir modül oluşturabilmek için pek çok çözünme hızı modeli toplanmıştır. Modellerin bulunduğu kütüphane oluşturulduktan sonra, salım verileri hangi modele uyuyorsa kolayca bulunur takiben hızlı bir şekilde her bir veri seti için dağılım noktalarının uyduğu eğriler, hata çubukları ve ortalama dağılım eğrileri oluşturulabilir.

Usta Yılmaz ve arkadaşlarının Türk ilaç pazarında flurbiprofen etkin maddesini içeren ürünleri için pH 4.5, pH 6.8, FaSSIF ve FeSSIF ortamlarında yaptığı in vitro çözünme hızı çalışmaları, DDSolver® ile çeşitli kinetikler ve f_2 testi açısından değerlendirilmiştir. pH 6.8 ortamında bütün eşdeğerlerin çözünme hızı profilleri inovatör ile benzer çıkarken ($f_2 > 50$), FaSSIF ve FeSSIF ortamları için sadece bir eşdeğer ürün inovatör ürün ile benzerlik göstermiştir. Çözünme hızı değerlendirmelerinde ise açıklık durumunda Gombertz kinetik modeline, tokluk durumunda Logistic kinetik modeline uyduğu belirlenmiştir (Usta Yılmaz et al., 2015).

SONUÇ

İn vitro çözünme hızı testleri, etkin maddenin karakterize edilmesi, formülasyonların geliştirilmesi, seçimi ve optimize edilmesi, ilaç salım mekanizmalarının anlaşılması, seriler arası tutarlılığın garantilenmesi, stabilitenin izlenmesi ve formülasyonlar arasında biyomuafiyetin gösterilmesini sağlayan önemli bir kalite ve performans göstergesidir.

Günümüzde in vitro çözünme hızı testinin, in vivo en yakın ortamlar olan biyoyoumlu ortamlar açısından değerlendirilmesi önemlidir. Yasal otoriteler açısından bu ortamların kullanımıyla harmonizasyon sağlayacak in vivo simülasyona dayalı bilgisayar yazılım teknolojileri, her alanda olduğu gibi ilaç endüstrisinde de etkinliğini hissettirmektedir. Eldeki verilere dayanarak geliştirilen in vitro in vivo simülasyon programlarının zaman ve maliyet açısından avantaj sağlayacak olması ve in vivo en iyi taklit eden in vitro çözünme hızı testlerinin geliştirilerek yasal düzenlemelere girmesi yeni ilaç geliştirme çalışmalarına büyük değer katacaktır.

KAYNAKLAR

- Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res.* 1995;12(3):413-20.
- Armand M, Borel P, Dubois C, Senft M, Peyrot J, Salducci J, Lafont H, Lairon D. Characterization of emulsions and lipolysis of dietary lipids in the human stomach. *Am J Physiol.* 266 (1994) G372–G381.
- Bayka C, Oran U, Adıyaman M, Teksin ZŞ. Biorelevant dissolution studies of ezetimibe, a BCS Class II Drug. International Multidisciplinary Symposium on Drug Research & Development, Antalya, Turkey, November 28-30, 2013.
- Butler JM, Dressman JB. The developability classification system: Application of biopharmaceutics concepts to formulation development. *J Pharm Sci.* 99 (2010) 4940–4954.
- Cvijić S, Parojčić J, Langguth P. Viscosity-mediated negative food effect on oral absorption of poorly-permeable drugs with an absorption window in the proximal intestine: *In vitro* experimental simulation and computational verification. *Eur J Pharm Sci.* 61 (2014), 40–53.
- Dokoumetzidis A, Valsami G and Macheras P. Modelling and simulation in drug absorption processes. *Xenobiotica* 2007;37(10-11):1052-1065.
- Dressman JB, Reppas C. In vitro-in vivo correlations for lipophilic, poorly water soluble drugs. *Eur J Pharm Sci.* 2000;11(2):S73-8.
- European Medicines Agency (EMA). Guideline on the investigation of bioequivalence, 20 January 2010.
- Food and Drug Administration (FDA), Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a Biopharmaceutics Classification System. Guidance for industry, August 2000.
- FDA Guidance for industry: Extended release oral dosage forms: Development, evaluation, and application of in vitro/in vivo correlations. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) September 1997.
- FDA, Guidance for industry: Immediate release solid oral dosage forms scale-up and post approval changes: Chemistry manufacturing and controls; in vitro dissolution testing and in vivo BE documentation. U.S. Department of Health and Human Services, CDER, 1995.
- FIP guidelines for dissolution testing of solid oral products, 1997.
- Fujioka Y, Kadono K, Fujie Y, Metsugi Y, Ogawara Ki, Higaki K, Kimura T. Prediction of oral absorption of griseofulvin, a BCS Class II drug, based on GITA model: Utilization of a more suitable medium for in-vitro dissolution study. *J Control Release.* 2007;119:222-228.
- Galia E, Nicolaidis E, et al. Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of Class I and II drugs. *Pharm Res.* 1998; 15(5): 698-705.
- Ghazal HS, Dyas AM, Ford JL, Hutcheon GA. In vitro evaluation of the dissolution behaviour of itraconazole in bio-relevant media. *Int J Pharm.* 2009;366: 117-123.
- Hayes S, Dunne A, Smart T, Davis J. Interpretation and optimization of the dissolution specifications for a modified release product with an in vivo-in vitro correlation (IVIVC). *J Pharm Sci.* 2004;93: 571-581.
- <http://biorelevant.com/biorelevant-media-types/>
<http://www.simulations-plus.com/software/dddplus/>
- Jantratid E, Janssen N, et al. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: An update. *Pharm Res.* 2008; 25(7): 1663-76.
- Jones HM, Gardner IB and Watson KJ. Modelling and PBPK simulation in drug discovery. *AAPS J.* 2009;11(1):155-166.
- Klein S. The use of biorelevant dissolution media to forecast the in vivo performance of a drug. *AAPS J.* 2010; 12(3): 397-406.
- Klein S, Butler J, Hempenstall JM, Reppas C, Dressman JB. Media to simulate the postprandial stomach I. Matching the physicochemical characteristics of standard breakfasts. *J Pharm Pharmacol.* 56 (2004), 605–610.
- Lobenberg R, Amidon GL. Modern bioavailability, bioequivalence and Biopharmaceutics Classification System. New scientific approaches to international regulatory standards. *Eur J Pharm Biopharm.* 2000; 50(1):3-12.
- Lue BM, Nielsen FS, Magnussen T, Schou HM, Kristensen K, Jacobsen L, Mullertz A. Using biorelevant dissolution to obtain IVIVC of solid dosage forms containing a poorly-soluble model compound. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;69:648-657.

- Markopoulos C, Andreas CJ, Vertzoni M, Dressman J, Reppas C. In-vitro simulation of luminal conditions for evaluation of performance of oral drug products: Choosing the appropriate test media. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015; 93:173-82.
- Pang KS, Durk MR. Physiologically-based pharmacokinetic modeling for absorption, transport, metabolism and excretion. *J Pharmacokin Pharmacodyn.* 2010;37(6):591-615.
- Radwan A, Wagner M, Amidon GL, Langguth P. Biopredictive tablet disintegration: Effect of water diffusivity, fluid flow, food composition and test conditions. *Eur J Pharm Sci.* 57 (2014), 273–279.
- Sarısaltık D, Teksin ZŞ. Biyoçeşitlilik Çalışmalarından Vazgeçilmesinde Biyofarmasötik İlaç Sınıflandırma Sistemlerinin Değerlendirilmesi: Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi (BCS) ve Biyofarmasötik İlaç Dağılım Sınıflandırma Sistemi (BDDCS). *Türkiye Klinikleri J Pharm Sci.* 2012,1(1):16-30.
- Shah VP. The role of dissolution testing in the regulation of pharmaceuticals: The FDA perspective. 2005. In J. Dressman and H. Lennernas, pharmaceutical dissolution testing. New York: Taylor & Francis Group, LCC, 81-97.
- Shah PV, Noory A, Noory C, McCullough B, Clarke S, Everett R, Naviasky H, Srinivasan BN, Fortman D, Skelly JP. In vitro dissolution of sparingly water-soluble drug dosage forms. *Int J Pharm.* 1995;125:99-106.
- Storey DE. The role of dissolution testing in the design of immediate release dosage forms. *Drug Inf J.* 1996; 30: 1039-1044.
- Sunesen VH, Pedersen BL, et al. In vivo in vitro correlations for a poorly soluble drug, danazol, using the flow-through dissolution method with biorelevant dissolution media. *Eur J Pharm Sci.* 2005;24(4): 305-13.
- Teksin ZŞ. Importance of biorelevant dissolution in drug development: For poorly soluble drugs and food effect studies. 18th International Symposium on Microencapsulation, Antalya, Turkey, September 12-14, 2011.
- Teksin ZŞ. The use of biorelevant dissolution media to forecast the in vivo performance of BCS Class 2 drug: Flurbiprofen. The 3rd PharmSciFair, Prague, Czech Republic, June 13-17, 2011.
- Tort S, Köksal HT, Teksin ZŞ. Implementation of BCS based biowaiver in Turkey. *Eur J Pharm Sci,* 50 (Supplement 1), 2013, 129-130.
- Tsume Y, Mudie DM, Langguth P, Amidon GE, Amidon GL. The Biopharmaceutics Classification System: Subclasses for in vivo predictive dissolution (IPD) methodology and IVIVC. *Eur J Pharm Sci.* 2014; 57: 152–163.
- Usta Yılmaz D, Demirtaş Ö, Uslu A, Ökçelik C, Teksin ZŞ. Evaluation of in vitro dissolution characteristics of non-steroidal antiinflammatory drugs in the Turkish drug market-1: Flurbiprofen, a BCS Class IIa drug. International Gazi Pharma Symposium Series, Antalya, Turkey, November 12-15, 2015.
- Vertzoni M, Markopoulos C, Symillides M, Goumas C, Imanidis G, Reppas C. Luminal lipid phases after administration of a triglyceride solution of danazol in the fed state and their contribution to the flux of danazol across Caco-2 cell monolayers. *Mol Pharm.* 9 (2012) 1189–1198.
- Vertzoni M, Diakidou A, Chatziliadis M, Söderlind E, Abrahamsson B, Dressman JB, Reppas C. Biorelevant media to simulate fluids in the ascending colon of humans and their usefulness in predicting intracolonic drug solubility. *Pharm Res.* 27 (2010), 2187–2196.
- Vertzoni M, Dressman J, Butler J, Hempenstall J, Reppas C. Simulation of fasting gastric conditions and its importance for the *in vivo* dissolution of lipophilic compounds. *Eur J Pharm Biopharm.* 60 (2005), 413–417.
- Vertzoni M, Fotaki N, Kostewicz E, Stippler E, Leuner C, Nicolaides E, Dressman J, Reppas C. Dissolution media simulating the intraluminal composition of the small intestine: Physiological issues and practical aspects. *J Pharm Pharmacol.* 56 (2004), 453–462.
- World Health Organization (WHO) General notes on Biopharmaceutics Classification System (BCS)-based biowaiver applications, October 2012.
- Yaşın Sarısaltık D, Bektaş D, Uslu A, Ökçelik C, Temel H, Teksin ZŞ. Evaluation of in vitro dissolution characteristics of non-steroidal antiinflammatory drugs in the Turkish drug market-2: Ibuprofen, a BCS Class IIa drug. International Gazi Pharma Symposium Series, Antalya, Turkey, November 12-15, 2015.
- Yong Z, Meirong H, Jianping Z, Aifeng Z, Weize L, Chengli Y, and Shaofei X. DDSolver: An add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *AAPS J. Vol.* 12, No.3, 2010.