



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**ÜÇ BOYUTLU BASKI TEKNİĞİ İLE YETİM İLAÇ
İÇEREN KATI İLAÇ FORMÜLASYONLARININ
TASARIMLA KALİTE (QbD) PRENSİPLERİNE
DAYANILARAK GELİŞTİRİLMESİ**

MEHTAP SAYDAM

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

TEMMUZ 2021



**ÜÇ BOYUTLU BASKI TEKNİĞİ İLE YETİM İLAÇ İÇEREN KATI İLAÇ
FORMÜLASYONLARININ TASARIMLA KALİTE (QbD)
PRENSİPLERİNE DAYANILARAK GELİŞTİRİLMESİ**

Mehtap SAYDAM

**DOKTORA TEZİ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2021

ÜÇ BOYUTLU BASKI TEKNİĞİ İLE YETİM İLAÇ İÇEREN KATI İLAÇ
FORMÜLASYONLARININ TASARIMLA KALİTE (QbD) PRENSİPLERİNE
DAYANILARAK GELİŞTİRİLMESİ
(Doktora Tezi)

Mehtap SAYDAM

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Temmuz 2021

ÖZET

“Yetim İlaçlar” nadir hastalıklara yönelik, pazar hacmi küçük ve Ar-Ge harcamaları yüksek ilaçlardır. Çalışmada eklemeli üretim yöntemi ile düşük ölçekli üretilmesi gereken ve Lennox-Gastout sendromunda kullanılan yetim ilaç grubundan rufinamit etkin maddesi için oral tablet formülasyonu geliştirilmiştir. Rufinamit suda çözünürlüğü düşük olan BCS Class II grubundan bir etkin maddedir. Düşük çözünürlüğünden dolayı 200 mg ile 1200 mg dozları arasında non-lineer farmakokinetik gösterir ve bu nedenle terapötik dozu çok yüksektir (3200 mg). Çalışmanın amacı rufinamitin çözünme davranışını hızlandırarak daha düşük dozlarda aynı etkinin sağlanacağı bir formülasyon geliştirmektir. Geliştirme çalışmaları tasarımıyla kalite (Quality by Design) prensipleri doğrultusunda risk analizi bazlı sistematik bir yaklaşımla gerçekleştirilmiştir. İn-vitro çözünme analizinde kullanılan analitik yöntem istatistiksel deney tasarımı ile incelenmiş olup tasarım alanı oluşturulmuştur. Üretim yönteminin çözünme üzerindeki etkisi incelendiğinde, formülasyon bileşenlerinin eriyik birikimleme (FDM) tekniğinde uygulanan filament ekstrüzyonu esnasında erime sonucu meydana gelen katı dispersiyonun çözünmeyi artırdığı, ilaveten üç boyutlu baskı (3DP) tasarım ile çözünmenin daha da yükseldiği tespit edilmiştir. Optimum formülasyon ve referans ürünün terapötik doz olan 1600 mg dozda çözümleri karşılaştırılmış olup geliştirilen optimum formülasyonun çok daha yüksek çözüldüğü tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen MTT sitotoksisite çalışmalarına göre hem Hep G2 hem de Caco-2 hücre hatlarında en yüksek hücre canlılığının optimum 3DP tablet ile elde edilebildiği gözlenmiştir. Caco-2 hücre hattında gerçekleştirilen permeabilite deneyleri sonuçları incelendiğinde en yüksek permeabilitenin optimum 3DP formülasyonu ile elde edildiği gözlenmiştir. Son olarak farmakokinetik veriler değerlendirildiğinde AUC ve C_{max} değerlerinin optimum 3DP tablet formülasyonunda referans ürün Inovelon® film tablete göre 40 mg/kg dozunda daha yüksek olduğu görülmüştür. Tez çalışmasında geliştirilen formülasyon ile etkin maddenin artan çözünürlüğü sayesinde ticari preparata kıyasla daha düşük dozla etkili bir tedavi sağlayan 3DP tablet formülasyonu geliştirilmiş ve bu etkinlik in-vitro ve in-vivo olarak kanıtlanmıştır.

Bilim Kodu : 1020

Anahtar : Eklemeli üretim, 3DP, Yetim ilaç, Katı ilaç formülasyonu, Çözünme,
Kelimeler : İntrinsik çözünme, Tasarımla kalite, Risk analizi, İstatistiksel deney tasarımı, Katı dispersiyon, Hücre kültürü, MTT, Farmakokinetik

Sayfa Adedi : 255

Danışman : Prof. Dr. Sevgi TAKKA

DEVELOPMENT OF ADDITIVE MANUFACTURED SOLID DOSAGE
FORMULATIONS CONTAINING ORPHAN
DRUG USING QUALITY BY DESIGN (QbD) PRINCIPLES

(Ph. D. Thesis)

Mehtap SAYDAM

GAZI UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

July 2021

ABSTRACT

“Orphan Drugs” are drugs for rare diseases, with a small market volume and high R&D expenditures. In this study, an oral tablet formulation was developed for rufinamide, which is one of the orphan drugs used in Lennox-Gastout syndrome, which needs to be produced in low scale. Rufinamide is an active substance from BCS Class II group with low water solubility. Due to its low solubility, it exhibits non-linear pharmacokinetics between 200 mg and 1200 mg doses, and therefore its therapeutic dose is very high (3200 mg). The aim of the study is to develop a formulation that will accelerate the dissolution behavior of rufinamide and provide the same effect at lower doses. Development studies were carried out with a risk analysis-based systematic approach in line with the principles of Quality by Design. The analytical method used in in-vitro dissolution analysis has been examined by statistical experimental design and a design space has been established. It was determined that the solid dispersion formed as a result of the melting of the formulation components during the filament extrusion applied in the FDM technique increased the dissolution, and the dissolution increased even more with the 3DP design. It was determined that the developed optimum formulation dissolved much higher than reference formulation at therapeutic dose (1600 mg). According to the MTT cytotoxicity studies carried out, it was observed that the highest cell viability could be achieved with the optimum 3DP tablet in both Hep G2 and Caco-2 cell lines. Additionally, it was observed that the highest Caco-2 permeability was obtained with the optimum 3DP formulation. Finally, the in-vivo pharmacokinetic behavior of the optimum 3DP tablet in the test and reference product was examined and it was seen that the AUC and C_{max} values were higher in the Optimum 3DP tablet formulation compared to the reference product Inovelon[®] film tablet at a dose of 40 mg / kg. With the developed formulation in the thesis study, thanks to the increased solubility of the active substance, the 3DP tablet formulation, which provides an effective treatment with a lower dose compared to the commercial preparation, was developed, and this efficiency was proven in-vitro and in-vivo.

Science Code : 1020

Key Words : Additive manufacturing, 3DP, Orphan drug, Solid dosage formulation, dissolution, intrinsic dissolution, quality by design, risk analysis, statistical design of experiment, solid dispersion, cell culture, MTT, pharmacokinetic

Page Number : 255

Supervisor : Prof. Dr. Sevgi TAKKA

TEŞEKKÜR

Daha önce yüksek lisans tezimi, ardından doktora tezimi planlayıp yöneten, bilgi ve tecrübesiyle sadece tez çalışmasında değil her aşamada yoluma ışık tutan, sorunlarımı sabırla dinleyip destek ve moral veren tez yöneticim, değerli hocam Sayın Prof. Dr. Sevgi TAKKA'ya,

Gösterdikleri yakın ilgi ve katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Füsün ACARTÜRK'e ve Prof. Dr. Nevin ÇELEBİ'ye, kendilerine her zaman danışabileceğimi hissettiren değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Fahriye Figen TIRNAKSIZ'a, Prof. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN'e, ihtiyacım olduğu her anda yardımcı ve destek olan Sayın Doç. Dr. Sibel İLBASMIŞ TAMER'e, Doç. Dr. Fatma Nur Tuğçu DEMİRÖZ'e, Dr. Öğr. Üyesi N. Başaran MUTLU AĞARDAN'a ve Dr. Öğr. Üyesi Serdar TORT'a, tüm fakülte ve bölüm arkadaşlarıma ve Fatma ÇELİK'e,

Daha önce yüksek lisans, ardından doktora çalışmalarım boyunca verdikleri bilimsel destek ve önerileri için Sayın Prof. Dr. Levent ÖNER'e,

Filamentlerin mekanik özelliklerinin incelenmesinde desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Ayhan SAVAŞER'e ve Dr. Öğr. Üyesi Özgür EŞİM'e, hücre kültürü çalışmalarında paylaştıkları bilgi ve tecrübeleri ile göstermiş oldukları yoğun emekleri için Sayın Prof. Dr. İmran VURAL'a ve Dr. Öğr. Üyesi Selin Seda TİMUR'a, in-vivo çalışmalarına katkılarından dolayı Sayın Doç. Dr. Mürşide Ayşe DEMİREL'e, İn-vivo farmakokinetik verilerin işlenmesinde yardımcı olan Sayın Arş. Gör. Dr. Tahir Emre YALÇIN'a ve Arş. Gör. Duygu YILMAZ USTA'ya,

02/2017-18 kodlu proje ile tez çalışmalarımı destekleyen Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimine,

Drogsan İlaçları San. ve Tic. A.Ş. Ar-Ge bölümünde birlikte çalıştığım mesai arkadaşlarıma ve çalışmalarım sırasında desteğini hiç bir zaman esirgemeyen Direktörüm Sayın Dr. Ecz. Mustafa ARISOY'a, Genel müdürüm Sayın Dr. Ersan KÜÇÜK'e ve Yönetim kurulu başkanım Sayın Mustafa KARPUZCU'ya,

Fikirleriyle, çalışmalarıyla ve paylaşımlarıyla dünyayla bağlantı kurmama ve büyük resmi görmeme yardımcı olan Sayın Dr. Pedro HERNANDEZ'e ve Dr. Ajaz HUSSAIN'e,

Son olarak sadece tez yazım aşamasında değil hayatımın her aşamasında beni sabırla dinleyen, anlayışla destek ve yardımcı olan canım anneme, babama, kardeşime, tüylü dostum Fidel'e ve en taze motivasyon kaynağımız yeğenim İdil ASLAN'a

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xvii
RESİMLERİN LİSTESİ	xxii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xxiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Nadir Hastalıklar	3
2.2. Yetim İlaçlar.....	4
2.3. Kişiselleştirilmiş Tedavi.....	6
2.4. Epilepsi.....	8
2.4.1. Nedenlerine göre epilepsi türleri.....	8
2.4.2. Nöbet tipine göre epilepsi türleri	9
2.4.3. Antiepileptik ilaçların etki mekanizması	10
2.5. Lennox-Gastaut Sendromu (LGS)	13
2.6. Rufinamit.....	15
2.6.1. Fizikokimyasal özellikler	16
2.6.2. Farmakokinetik özellikler	20
2.6.3. Formülasyon tipleri	23
2.6.4. Farmakoeкономи	25
2.7. Eklemeli Üretim	25

	Sayfa
2.7.1. Genel bilgilendirme.....	25
2.7.2. Eklemeli üretimin üstünlükleri.....	31
2.7.3. Eklemeli üretim çeşitleri	32
2.8. Katı Dispersiyonlar	47
2.8.1. Katı dispersiyonların çözünürlük ve biyoyararlanım artırma mekanizmaları	48
2.8.2. Katı dispersiyonların sınıflandırılması.....	49
2.8.3. Katı dispersiyonlarda sıklıkla kullanılan yardımcı maddeler	54
2.8.4. Sıcak eriyik ekstrüzyonu (HME) ile katı dispersiyonların hazırlanması	60
2.8.5. Katı dispersiyonlardan salım mekanizmaları.....	64
2.8.6. Katı dispersiyonların üstünlükleri.....	64
2.8.7. Katı dispersiyonlarda yaşanan zorluklar	65
2.8.8. Katı dispersiyonlarda yapılan kontroller.....	66
2.9. Farmasötik eklemeli üretim çalışmalarında tasarımı kalite (QbD) yaklaşımı	68
2.9.1. Kalite hedefli ürün profili (QTPP).....	70
2.9.2. Kritik kalite özelliği (CQA)	70
2.9.3. Risk değerlendirme (RA).....	70
2.9.4. Tasarım alanı (DSp) ve istatistiksel deney tasarımı (DoE).....	75
2.9.5. Kontrol stratejisi.....	78
2.9.6. Ürün yaşam döngüsü yönetimi (PQLI).....	79
2.10. Hücre Kültürü Çalışmaları	79
2.10.1. MTT testi ile sitotoksitite	79
2.10.2. İntestinal permeabilite ve Caco-2 hücre hattından permeabilite.....	81
2.11. Denge Çözünürlük ve İntrinsik Çözünme	84
3. GEREÇ VE YÖNTEM	89
3.1. Gereç	89

	Sayfa
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	89
3.1.2. Kullanılan alet ve malzemeler.....	91
3.2. Yöntem	92
3.2.1. Ön formülasyon çalışmaları	92
3.2.2. Rufinamitin miktar tayini yöntemlerinin geliştirilmesi ve validasyonu	95
3.2.3. Referans ürün karakterizasyonu	103
3.2.4. Formülasyon geliştirme çalışmaları öncesinde risk analizleri	103
3.2.5. Plasebo filament formülasyonlarının geliştirilmesi üzerine çalışmalar	104
3.2.6. Rufinamit yüklü 3DP tablet formülasyonlarının geliştirilmesi üzerine çalışmalar	110
3.2.7. Rufinamit içeren filament ekstrüzyonu sonrası ekstrüder temizlik yönteminin geliştirilmesi.....	113
3.2.8. Rufinamit içeren konvansiyonel tablet hazırlama yöntemi.....	115
3.3. Optimum Filament ve 3DP Tablet Formülasyonu Üzerinde Yapılan Kontroller	116
3.3.1. Geçimlilik testleri.....	116
3.3.2. Filamentlerde yapılan fiziksel testler	117
3.3.3. 3DP tabletlerde yapılan fiziksel testler ve miktar tayini	117
3.3.4. In-vitro çözünme tayini	118
3.3.5. İntrinsik çözünme tayini.....	118
3.3.6. Salım kinetiği	119
3.3.7. In-vitro stabilite çalışmaları	119
3.3.8. Formülasyonların morfolojik özelliklerinin belirlenmesi	120
3.3.9. Hücre kültürü çalışmaları.....	120
3.3.10. Ticari ürün Inovelon® film tablet ve optimum 3DP tablet formülasyonları ile yapılan in-vivo çalışmalar.....	124
4. BULGULAR	127
4.1. Ön Formülasyon Çalışmaları	127

Sayfa

4.1.1. Rufinamitin denge çözünürlük tayini.....	127
4.1.2. Rufinamitin erime derecesi tayini	127
4.1.3. Rufinamitin kristal modifikasyonunun incelenmesi	128
4.1.4. Rufinamitin FTIR analizi	129
4.1.5. Rufinamitin partikül büyüklüğü dağılımının ölçülmesi.....	130
4.1.6. Rufinamitin toz akış özelliklerinin belirlenmesi.....	131
4.1.7. Rufinamitin kütle spektrumu	131
4.1.8. Rufinamitin UV spektrumu.....	131
4.2. Rufinamitin Miktar Tayini Yöntemlerinin Geliştirilmesi ve Validasyonu	132
4.2.1. Miktar tayini yöntemi (Yöntem 1).....	132
4.2.2. Miktar tayini yöntemi (Yöntem 2).....	143
4.3. Referans Ürün Karakterizasyonu.....	149
4.4. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları Öncesinde Risk Analizleri	151
4.5. Plasebo filament formülasyonları üzerinde yapılan çalışmalar.....	154
4.6. Rufinamit yüklü 3DP tablet formülasyonlarının geliştirilmesi üzerine çalışmalar.....	156
4.7. Rufinamit içeren filament ekstrüzyonu sonrası ekstrüder temizlik yönteminin geliştirilmesi	160
4.8. Optimum Filament ve 3DP Tablet Formülasyonu Üzerinde Yapılan Kontroller	160
4.8.1. Geçimlilik testleri.....	160
4.8.2. In-vitro çözünme tayini.....	166
4.8.3. İntrinsik çözünme tayini.....	175
4.8.4. Salım kinetiği	176
4.8.5. In-vitro stabilite çalışmaları	178
4.8.6. Formülasyonların morfolojik özelliklerinin belirlenmesi	180
4.8.7. Hücre kültürü çalışmaları.....	186

Sayfa

4.8.8. Ticari ürün Inovelon® film tablet ve optimum 3DP tablet formülasyonları ile yapılan in-vivo çalışmalar.....	193
5. TARTIŞMA.....	199
5.1. Ön Formülasyon Çalışmaları	199
5.1.1. Rufinamitin denge çözünürlük tayini.....	199
5.1.2. Rufinamitin erime derecesi tayini	200
5.1.3. Rufinamitin kristal modifikasyonunun incelenmesi	201
5.1.4. Rufinamitin FTIR analizi	201
5.1.5. Rufinamitin partikül büyüklüğü dağılımının ölçülmesi.....	201
5.1.6. Rufinamitin toz akış özelliklerinin belirlenmesi.....	202
5.1.7. Rufinamitin kütle spektrumu	203
5.1.8. Rufinamitin UV spektrumu.....	203
5.2. Rufinamitin Miktar Tayini Yöntemlerinin Geliştirilmesi ve Validasyonu	203
5.2.1. Miktar tayini yöntemi (Yöntem 1) validasyonu.....	203
5.2.2. Miktar tayini yöntemi (Yöntem 2) validasyonu.....	205
5.3. Referans Ürün Karakterizasyonu.....	206
5.4. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları Öncesinde Risk Analizleri	207
5.5. Plasebo filament formülasyonları üzerinde yapılan çalışmalar.....	208
5.6. Rufinamit yüklü 3DP tablet formülasyonlarının geliştirilmesi üzerine çalışmalar.....	210
5.7. Rufinamit içeren filament ekstrüzyonu sonrası ekstrüder temizlik yönteminin geliştirilmesi	210
5.8. Optimum Filament ve 3DP Tablet Formülasyonu Üzerinde Yapılan Kontroller	211
5.8.1. Geçimlilik testleri.....	211
5.8.2. In-vitro çözünme tayini.....	212
5.8.3. İntrinsik çözünme tayini.....	218
5.8.4. Salım kinetiği	218

	Sayfa
5.8.5. In-vitro stabilite çalışmaları	218
5.8.6. Formülasyonların morfolojik özelliklerinin belirlenmesi	219
5.8.7. Hücre kültürü çalışmaları	219
5.8.8. Ticari ürün Inovelon® film tablet ve optimum 3DP tablet formülasyonları ile yapılan in-vivo çalışmalar	222
6. SONUÇ	225
KAYNAKLAR	227
EKLER	251
EK-1. Etik kurul onayı	252
ÖZGEÇMİŞ	253

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Nöbet tipine göre epilepsi türleri	9
Çizelge 2.2. Antiepileptik ilaçlar	11
Çizelge 2.3. Rufinamitin fizikokimyasal özellikleri.....	17
Çizelge 2.4. Rufinamitin HPLC ile miktar tayini analiz yöntemleri	19
Çizelge 2.5. Rufinamitin farmakokinetik özellikleri	21
Çizelge 2.6. 600 mg dozda (b.i.d) üç farklı uygulama şekli için denge durumu plazma simülasyonu	22
Çizelge 2.7. Katı ilaç şekilleri için eklemeli üretim yönteminin geleneksel üretim yöntemlerine göre üstünlükleri.....	31
Çizelge 2.8. Eklemeli üretim yöntemlerine ait özellikler	33
Çizelge 2.9. Eklemeli üretim yöntemi çeşitlerinin üstünlükleri ve sakıncaları	34
Çizelge 2.10. FDM-3DP yönteminde karşılaşılabilecek başlıca problemler	38
Çizelge 2.11. FDM tekniği ile ilaç üretimi üzerine yapılmış literatür çalışmaları	43
Çizelge 2.12. Katı dispersiyonlarda sıklıkla kullanılan taşıyıcı örnekleri	55
Çizelge 2.13. Tez çalışmasında incelenen Gelucire® türevleri	56
Çizelge 2.14. Biyoyararlanımı artırdığı bilinen ve sıklıkla kullanılan yağ asitlerine ait özet fizikokimyasal bilgiler.....	57
Çizelge 2.15. Eritme metodu ile üretilmiş ve ruhsatlandırılmış oral kullanılan dünya piyasasından ürün örnekleri	63
Çizelge 2.16. Farmasötik eklemeli üretim (FDM-3DP) geliştirme çalışmalarında literatürde tespit edilen CMA'lar.....	72
Çizelge 2.17. Farmasötik eklemeli üretim (FDM-3DP) geliştirme çalışmalarında literatürde tespit edilen CPP'ler.....	74
Çizelge 2.18. HME yöntem gelişiminde kullanılan DoE çalışmaları	77
Çizelge 2.19. FDM-3DP üretim yöntemi için kontrol stratejisi.....	78
Çizelge 2.20. Hücre kültürü çalışmalarının üstünlükleri ve sakıncaları	79
Çizelge 2.21. Literatürde kullanılan IDR analiz parametreleri.....	87

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler	89
Çizelge 3.2. Kullanılan alet ve malzemeler	91
Çizelge 3.3. Rufinamitin HPLC analiz yöntemi (Yöntem 1) parametreleri	96
Çizelge 3.4. İstatistiksel merkezi tekrarlı deney tasarımı kullanılarak yöntem parametrelerinde yapılan değişiklikler	99
Çizelge 3.5. Rufinamitin biyoanalitik tayininde kullanılan UPLC-MS yöntemi (Yöntem 2) parametreleri.....	100
Çizelge 3.6. Farklı polimerlere ait fizikokimyasal içerikler.....	105
Çizelge 3.7. Farklı polimerleri içeren plasebo formülasyonlara ait içerikler (%)	106
Çizelge 3.8. Farklı plastikleştiricilere ait fizikokimyasal özellikler	107
Çizelge 3.9. Farklı plastikleştiriciler içeren plasebolara ait içerikler (%).....	107
Çizelge 3.10. Farklı sürfaktanlara ait fizikokimyasal özellikler.....	108
Çizelge 3.11. Farklı sürfaktanları içeren plasebo formülasyonlara ait içerikler (%)	109
Çizelge 3.12. Rufinamit yüklü formülasyonlarda farklı sürfaktanların çözünme üzerinde etkisinin incelenmesi için hazırlanan formülasyonlara ait içerikler (%) ...	112
Çizelge 3.13. Rufinamit yüklü formülasyonlarda farklı sürfaktan oranlarının çözünme üzerinde etkisinin incelenmesi için hazırlanan formülasyonlara ait içerikler (%)	112
Çizelge 3.14. Dispersant maddenin çözünme üzerinde etkisinin incelenmesi için hazırlanan formülasyonlara ait içerikler (%)	112
Çizelge 3.15. Filament ekstrüderi temizleyici madde tipleri.....	114
Çizelge 3.16. Farmakokinetik çalışma için yapılan doz dönüşümü hesabı.....	124
Çizelge 3.17. Farmakokinetik çalışma için hayvanların gruplandırılması.	124
Çizelge 4.1. Farklı çözünürlük ortamlarında Rufinamit denge çözünürlük değerleri....	127
Çizelge 4.2. Rufinamitin kristal modifikasyonu.....	129
Çizelge 4.3. Rufinamitin yapısında bulunan bağlar.....	130
Çizelge 4.4. Rufinamitin %2 SLS içeren saf su ortamındaki doğruluk ve geri elde sonuçları	133

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.5. Rufinamitin %2 SLS içeren saf su ortamındaki deney içi kesinlik sonuçları	134
Çizelge 4.6. Rufinamitin %2 SLS içeren saf su ortamındaki deneyler arası kesinlik sonuçları (Analist: 1, Cihaz: 1) (Analist: 1, Cihaz: 2)	135
Çizelge 4.7. Rufinamitin %2 SLS içeren saf su ortamındaki filtre etkisi sonuçları	137
Çizelge 4.8. Deney tasarımı çalışmaları sonuçları	138
Çizelge 4.9. İstatistiksel deney tasarımı ANOVA sonuçları ((a) standart çözelti, (b) test çözelti)	139
Çizelge 4.10. İstatistiksel olarak geliştirilmiş matematiksel eşitlikler ve tasarım alanı geliştirmek için belirlenen optimizasyon limitleri	141
Çizelge 4.11. Standart ve Test çözeltisi stabilite sonuçları	143
Çizelge 4.12. Rufinamitin plazma içindeki çözeltisinden ekstraksiyon etkinliği	144
Çizelge 4.13. Rufinamitin plazma içindeki deney içi kesinlik sonuçları	145
Çizelge 4.14. Rufinamitin plazma içindeki deneyler arası kesinlik sonuçları	146
Çizelge 4.15. Rufinamitin otomatik örnekleyici stabilitesi	149
Çizelge 4.16. Rufinamitin dondurma-çözme stabilitesi	149
Çizelge 4.17. Referans ürün olan Inovelon® Film Tablet (Eisai, Japonya) için kalitatif ve kantitatif özellikler (Portman, Hoffmeier, Burkhard, Sherrer ve Szlagiewicz, 2004)	150
Çizelge 4.18. Referans ürün olan Inovelon® Film Tablet (Eisai, Japonya) için fizikokimyasal özellikler	150
Çizelge 4.19. QTPP ve CQA tespiti için oluşturulan sebep-sonuç matrisi	152
Çizelge 4.20. Plasebo filamentlerine ait mekanik özellikler (n=3, Ort $\pm$ SS)	155
Çizelge 4.21. Farklı sürfaktan tipleri, sürfaktan oranları, dispersant etkisi ve konvansiyonel tabletin etkisinin incelenmesi için hazırlanan rufinamit yüklenen formülasyonlar üzerinde yapılan fizikokimyasal ve mekanik özellikler (n=3, Ort $\pm$ SS)	157
Çizelge 4.22. Farklı iç dolgu oranları ve dış geometrilerin etkisinin incelenmesi için hazırlanan rufinamit yüklenen formülasyonlar üzerinde yapılan fizikokimyasal ve mekanik özellikler (Formülasyon No: A05) (n=3, Ort $\pm$ SS)	158

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.23. Optimum 3DP formülasyonuna ait içerik bilgisi.....	159
Çizelge 4.24. Rufinamit, fiziksel karışım, filament, 3DP tablet, 3DP plasebo tablet ve referans ürün olan Inovelon® Film tablete ait XRD difraktogramı verileri	162
Çizelge 4.25. Rufinamit, Optimum formülasyona ait fiziksel karışım (rufinamit içerir), Optimum formülasyona ait plasebo fiziksel karışımı (rufinamit içermez), Optimum formülasyona ait 3DP tablet ve referans ürün (Inovelon® Film Tablet) Spesifik dalga sayıları.....	165
Çizelge 4.26. Farklı çözünürlük ortamlarında saf etkin madde (rufinamit) ve optimum 3DP tabletlerden rufinamitin intrinsik çözünme hızı verileri (n=3, Ort $\pm$ SS) ..	175
Çizelge 4.27. Farklı formülasyonlara ait salım kinetikleri ve uyum ölçütleri	177
Çizelge 4.28. In-vitro stabilite çalışması fizikokimyasal sonuçları	178
Çizelge 4.29. MTT testi için üç grup arasındaki farkın ANOVA ile istatistiksel olarak incelenmesi	188
Çizelge 4.30. Literatüre göre Papp değerlerine göre permeabilite sınıflandırması	190
Çizelge 4.31. Permeabilite testi için üç grup arasındaki farkın ANOVA ile istatistiksel olarak incelenmesi	190
Çizelge 4.32. Referans ürün ve 3DP tablet birim formülün kalitatif içeriğinin sitotoksisite ve permeabilite açısından değerlendirmesi.....	191
Çizelge 4.33. Optimum 3DP tablet ve Inovelon®'a ait farmakokinetik parametreler (n=6 $\pm$ CI)	196
Çizelge 4.34. Farmakokinetik parametreler için Optimum 3DP tablet ve Inovelon® arasındaki farkın ANOVA ile istatistiksel olarak incelenmesi	197
Çizelge 5.1. Elde edilen farmakokinetik parametrelerin literatür ile karşılaştırması	222

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Dünya genelinde yetim ilaç satışı ve genel ilaç satışındaki oranı	6
Şekil 2.2. Kişiselleştirilmiş ilaç üretim yöntemi (a) Üretim alanı: (b) Üç farklı ilaç içeren kişiselleştirilmiş ilaç.....	8
Şekil 2.3. Çeşitli antikonvülzan ilaçların etki mekanizmaları	11
Şekil 2.4. Çeşitli epilepsi türlerinin tedavisinde kullanılan antikonvülzan ilaçların endikasyonları.....	12
Şekil 2.5. 24 yaşında uyanık erkek LGS hastasına ait SSW görünümünde EEG	14
Şekil 2.6. Rufinamitin molekül yapısı	16
Şekil 2.7. Rufinamitin sağlıklı gönüllülerde 600 mg oral uygulaması sonucu açlık (fasted) ve tokluk (fed) koşullarında elde edilen plazma derişimleri ($\pm$ S.E.M.)	22
Şekil 2.8. Karbamazepin (■), Okskarbazepin (●) ve Rufinamit (▲) HPMC katı dispersiyonlarının (1:4) saf sudaki çözünme profilleri (A) Katı dispersiyon: (B) Saf etkin madde (Ort. $\pm$ SS (n = 3)).....	24
Şekil 2.9. Charles W. Hull tarafından ilk defa geliştirilen ve patentlenen 3D yazıcıya ait (a) patent isteminde tarif edilen cihaz çizimi (Hull, 1986), (b) cihaz görünümü (3dprint, 2015).....	26
Şekil 2.10. Türkiye’de mevcut 3 boyutlu yazıcı durumu.....	27
Şekil 2.11. Endüstriyel eklemeli imalat tezgâhlarının ülkelere göre dağılımı.....	27
Şekil 2.12. Eklemeli üretim basamakları	28
Şekil 2.13. Zipdose® teknolojisi görsel (a) Teknolojinin şematik gösterimi: (b) Aprecia firmasında kullanılan yazıcı	29
Şekil 2.14. Eklemeli üretim yöntemi ile üretilebilecek farklı geometrilerde katı ilaç şekilleri (a) basit disk, (b) oval, (c) kolay yutulabilir kaplet, (d) kısmen delikli tablet, (e,f) çekirdek ve kılıfın farklı içerikle tasarlandığı sistemler, (g) sıfır derece kinetikle salım yapan çörek biçimli tablet, (h) pulsatil salım yapan sistem, (i) jel dolgulu hızlandırılmış salım yapan sistem, (j,k) iki etkin maddeyi ayrı ayrı salım yapabilecek sistemler, (l) farklı salım hızlarına sahip birden fazla etkin madde içeren sistemler.....	35
Şekil 2.15. Katı dispersiyonlarda etkin maddenin bulunma şekilleri (a) Katı çözelti oluşturan moleküler dağılım, (b) Amorf dispersiyon oluşturan amorf durum, (c) Basit dispersiyon oluşturan kristal durum, (d) Kolloidal dispersiyon oluşturan kolloidal durum	48

Şekil	Sayfa
Şekil 2.16. Partikül büyüklüğüne göre katı dispersiyonların gruplandırılması	49
Şekil 2.17. Katı dispersiyonların dört jenerasyon olarak sınıflandırılması.....	50
Şekil 2.18. Katı dispersiyon jenerasyonlarına ait temsili çözünme profilleri (0) Saf etkin madde, (1) Birinci jenerasyon katı dispersiyon, (2) İkinci jenerasyon katı dispersiyon, (3) Üçüncü jenerasyon katı dispersiyon, (4) Dördüncü jenerasyon katı dispersiyon.....	50
Şekil 2.19. Biyoyararlanımı artırdığı bilinen ve sıklıkla kullanılan yağ asitlerine ait yapısal farklar.....	57
Şekil 2.20. HLB değerine göre maddelerin suda ya da yağdaki çözünürlük özellikleri.....	58
Şekil 2.21. Gastrointestinal sistemde lipidlerin enzimatik sindirimi ve emilimi.....	60
Şekil 2.22. Katı dispersiyon hazırlama yöntemleri.....	61
Şekil 2.23. HME cihazı ve kullanılan vida tipleri.....	62
Şekil 2.24. Farmasötik endüstride sıklıkla kullanılan risk analizi yöntemleri.....	71
Şekil 2.25. Farmasötik endüstride kullanım alanlarına göre DoE	76
Şekil 2.26. MTT reaksiyonunun kimyasal gösterimi	80
Şekil 2.27. Mikroporöz bir filtrede Caco-2 hücrelerinin kültürünün şematik gösterimi	82
Şekil 2.28. USP <1087> de tanımlanan IDR sistemlerine ait resimler (a) Dönen disk (rotating disk, Wood apparatus), (b) Sabit disk (stationary disk)	86
Şekil 3.1. FDM-3DP yöntemi ile tabletlerin hazırlanması	111
Şekil 3.2. Farklı iç dolgu oranlarında üretilen tabletlere ait görüntüler.....	113
Şekil 3.3. Farklı dış geometrilerle üretilen tabletlere ait görüntüler	113
Şekil 3.4. Ekstrüder temizlik yöntemi tespiti prosedürü.....	115
Şekil 3.5. İntrinsik çözünme aparatı	119
Şekil 3.6. SEM görüntüleme için numunelerin hazırlanışı.....	120
Şekil 3.7. (a) Caco-2 hücrelerinin well-plate'lere ekimi. (b) Caco-2 hücrelerinin faz kontrast görüntüleri (10x) (c) Caco-2 hücrelerinin faz kontrast görüntüleri (20x) (d) Caco-2 hücrelerinin faz kontrast görüntüleri (40x)	123
Şekil 3.8. Sıçan kuyruk veninden kan alma görüntüleri.....	125

Şekil	Sayfa
Şekil 4.1. Rufinamitin erime derecesi tayini.....	128
Şekil 4.2. Rufinamitin kristal modifikasyonu.....	128
Şekil 4.3. Rufinamitin FTIR spektrumu.....	129
Şekil 4.4. Rufinamitin partikül büyüklüğü dağılımı.....	130
Şekil 4.5. Rufinamitin kütle spektrumu	131
Şekil 4.6. Rufinamitin UV spektrumu.....	132
Şekil 4.7. Rufinamitin %2 SLS içeren saf su ortamındaki kalibrasyon doğrusu...	133
Şekil 4.8. Çözücünün %2 SLS içeren saf su ortamındaki kromatogramı.....	135
Şekil 4.9. Plasebonun %2 SLS içeren saf su ortamındaki kromatogramı	136
Şekil 4.10. Test çözeltisinin %2 SLS içeren saf su ortamındaki kromatogramı.....	136
Şekil 4.11. Standart çözeltisinin %2 SLS içeren saf su ortamındaki kromatogramı..	136
Şekil 4.12. Tasarım alanı ve Yüzey cevap grafikleri.....	142
Şekil 4.13. Rufinamitin sıçan plazmasındaki kalibrasyon doğrusu.....	144
Şekil 4.14. Blank plazmaya ait kromatogram.....	148
Şekil 4.15. Mobil faza ait kromatogram.....	148
Şekil 4.16. Standart çözeltiye ait kromatogram.....	148
Şekil 4.17. Tüm varyasyon kaynaklarının gösterildiği balık kılçığı diyagramı.....	151
Şekil 4.18. Kritik materyal özelliklerinin (CMAs) tespiti amacıyla gerçekleştirilen Lean QbD® analizi sonuçları (<i>Kırmızı özellikler "Kritik" materyal özellikleridir. Sarı özellikler "Kontrol edilmesi gereken" materyal özellikleridir. Yeşil özellikler "Kritik olmayan" materyal özellikleridir.</i>).....	153
Şekil 4.19. Kritik proses parametrelerinin (CPPs) tespiti amacıyla gerçekleştirilen Lean QbD® analizi sonuçları (<i>Kırmızı parametreler "Kritik" proses parametreleridir. Sarı parametreler "Kontrol edilmesi gereken" proses parametreleridir. Yeşil parametreler "Kritik olmayan" proses parametreleridir.</i>).....	153
Şekil 4.20. Filament ekstrüderi temizleyici madde tipi ve miktarına bağlı olarak elde edilen Rufinamit % miktar tayini verileri.....	160

Şekil	Sayfa
Şekil 4.21. Rufinamit, Rufinamit: Triasetin 1:1 karışımı, Rufinamit: Gelucire® 48/16 1:1 karışımı, Rufinamit: Soluplus® 1:1 karışımı, fiziksel karışım, filament, 3DP tablet, 3DP plasebo tablet ve referans ürün olan Inovelon® Film tablete ait DSC termogramı.....	161
Şekil 4.22. Rufinamit, fiziksel karışım, filament, 3DP tablet, 3DP plasebo tablet ve referans ürün olan Inovelon® Film tablete ait XRD difraktogramı.....	161
Şekil 4.23. Rufinamit FTIR Spektrumu.....	162
Şekil 4.24. Optimum formülasyona ait fiziksel karışım (rufinamit içerir) FTIR Spektrumu.....	163
Şekil 4.25. Optimum formülasyona ait plasebo fiziksel karışımı (rufinamit içermez) FTIR Spektrumu.....	163
Şekil 4.26. Optimum formülasyona ait 3DP tablet FTIR Spektrumu.....	164
Şekil 4.27. Referans ürün (Inovelon® Film Tablet) FTIR Spektrumu.....	164
Şekil 4.28. Farklı tiplerde sürfaktan içeren 3DP tabletlerden rufinamitin çözünme verileri (%2 SLS içeren saf su, 900 mL, 37°C) (n=3, Ort ± SS).....	166
Şekil 4.29. Farklı oranlarda sürfaktan içeren 3DP tabletlerden rufinamitin çözünme verileri (%2 SLS içeren saf su, 900 mL, 37°C) (n=3, Ort ± SS)	167
Şekil 4.30. Optimum 3DP tablet formülasyonu için dispersant içermeyen tabletlerden rufinamitin çözünme verileri (%2 SLS içeren saf su, 900 mL, 37°C) (n=3, Ort ± SS).....	168
Şekil 4.31. Farklı iç dolgu oranlarında tasarlanmış 3DP tabletlerden rufinamitin çözünme verileri (%2 SLS içeren saf su, 900 mL, 37°C) (n=3, Ort ± SS).....	169
Şekil 4.32. Farklı dış geometrilerde tasarlanmış 3DP tabletlerden rufinamitin çözünme verileri (%2 SLS içeren saf su, 900 mL, 37°C) (n=3, Ort ± SS).....	170
Şekil 4.33. Optimum 3DP tablet formülasyonu için farklı üretim basamaklarından rufinamitin çözünme verileri (%2 SLS içeren saf su, 900 mL, 37°C) (n=3, Ort ± SS).....	171
Şekil 4.34. Optimum 3DP tablet formülasyonu ve referans ürünün farklı pH'larda çözünme karşılaştırması (n=3, Ort ± SS)	172

Şekil	Sayfa
Şekil 4.35. 200 mg ve Terapötik dozlarda optimum 3DP tablet formülasyonu ve referans ürünlerden (Inovelon® Film Tablet) rufinamitin çözünme verileri (%2 SLS içeren saf su, 900 mL, 37°C) (n=3, Ort ± SS).....	173
Şekil 4.36. Farklı dozlarda optimum 3DP tablet formülasyonu tabletlerinden rufinamitin çözünme verileri ve in-vitro doğrusallık (%2 SLS içeren saf su, 900 mL, 37°C) (n=3, Ort ± SS).....	174
Şekil 4.37. Farklı çözünürlük ortamlarında saf etkin madde (rufinamit) ve optimum 3DP tabletlerden rufinamitin intrinsik çözünme verileri (n=3, Ort ± SS).....	175
Şekil 4.38. In-vitro stabilite çalışması çözünme sonuçları (%2 SLS içeren saf su, 900 mL, 37°C) (n=3, Ort ± SS).....	179
Şekil 4.39. Caco-2 hücrelerinde elde edilen hücre canlılık değerleri.....	187
Şekil 4.40. Hep G2 hücrelerinde elde edilen hücre canlılık değerleri.....	188
Şekil 4.41. Caco-2 hücrelerinde elde edilen permeabilite değerleri.....	189
Şekil 4.42. 20 mg /kg dozda rufinamit içeren Optimum 3DP tablet (A05) uygulanan hayvanlardan elde edilen derişim- zaman profilleri (n=6)....	193
Şekil 4.43. 20 mg /kg dozda rufinamit içeren ticari ürün Inovelon® uygulanan hayvanlardan elde edilen derişim- zaman profilleri (n=6).....	193
Şekil 4.44. 40 mg /kg dozda rufinamit içeren Optimum 3DP tablet (A05) uygulanan hayvanlardan elde edilen derişim- zaman profilleri (n=6)....	194
Şekil 4.45. 40 mg /kg dozda rufinamit içeren ticari ürün Inovelon® uygulanan hayvanlardan elde edilen derişim - zaman profilleri (n=6).....	194
Şekil 4.46. 20 mg /kg dozda rufinamit içeren ürün uygulanan hayvanlardan elde edilen ortalama derişim - zaman profilleri (n=6±CI).....	195
Şekil 4.47. 40 mg /kg dozda rufinamit içeren ürün uygulanan hayvanlardan elde edilen ortalama derişim - zaman profilleri (n=6±CI).....	195
Şekil 4.48. İn-vivo plazma profili ile in-vitro çözünme ilişkisi.....	196

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Referans ürün (Inovelon® Film Tablet) için elde edilen SEM görüntüleri....	180
Resim 4.2. Optimum formülasyona ait filament için elde edilen SEM görüntüleri	181
Resim 4.3. Optimum formülasyona ait plasebo filament için elde edilen SEM görüntüleri.....	182
Resim 4.4. Optimum formülasyona ait 3DP tablet için elde edilen SEM görüntüleri (İç dolgu oranı: %10).....	183
Resim 4.5. Optimum formülasyona ait 3DP tablet için elde edilen SEM görüntüleri (İç dolgu oranı: %50).....	184
Resim 4.6. Optimum formülasyona ait 3DP tablet için elde edilen SEM görüntüleri (İç dolgu oranı: %100).....	185

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

Açıklamalar

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
a	Ağırlık
g	Gram
h	Hacim
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
L	Litre
m ²	Metrekare
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm ³	Milimetreküp
nm	Nanometre

Kısaltmalar

Açıklamalar

% RSD	% Bağlı hata
3DP	3 boyutlu baskı
ACN	Asetonitril
AEI	Antiepileptik ilaç
AIC	Akaike bilgi kriteri
ANOVA	Varyansların analizi
Ar-Ge	Araştırma geliştirme
ASTM	The American Society for Testing and Materials
AUC	Eğri altında kalan alan

Kısaltmalar**Açıklamalar**

BCS	Biyofarmasötik sınıflandırma sistemi
Caco-2	İnsan kolorektal kanser hücre hattı
CI	Güven aralığı
C_{max}	Maksimum plazma derişimi
CO₂	Karbondioksit
CQA	Kritik kalite özelliğı
CYP450	Sitokrom P 450 izoenzim
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DoE	Deney tasarımı
DSC	Diferansiyal taramalı kalorimetri
Dsp	Tasarım alanı
EC	Etil selüloz
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
FBS	Fetal bovin serumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FDM	Eriyik birikimleme
FT-IR	Fourier Dönüştürülmüş Kızılötesi Spektroskopisi
GI	Gastrointestinal
Hep G2	İnsan karaciğer kanseri hücre hattı
HME	Sıcak eriyik ekstrüzyonu
HPC	Hidroksipropil selüloz
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
HPMC	Hidroksipropil metilselüloz
ICH	Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı
ISO	International Organization for Standardization
LC/MS	Yüksek performanslı sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi
LD₅₀	Letal Doz
LGS	Lennox-Gastaut sendromu
LOD	Teşhis sınırı
LOQ	Tayin sınırı
MC	Metil selüloz

Kısaltmalar**Açıklamalar**

MRT	Ortalama kalış süresi
ORT	Ortalama
PAT	Proses analitik teknolojileri
PEG	Polietilen glikol
PGA	Poliglikolik asit
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Poli (laktik-ko-glikolik asit)
PQLI	Ürün yaşam döngüsü yönetimi
PVA	Polivinil alkol
PVP	Polivinil pirolidon
QbD	Tasarımla kalite
QTPP	Kalite hedefli ürün profili
RA	Risk analizi
RH	Bağıl nem
rpm	Dakikada dönme sayısı
s	Saat
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SS	Standart sapma
t_{1/2}	Yarılanma ömrü
TEB	Türk Eczacılar Birliği
TEER	Transepitelyal elektrik direnci
TGA	Termal gravimetrik analizi
t_{max}	Maksimum derişime ulaşma zamanı
UV	Ultraviyole
V_d	Dağılım hacmi
XRD	Toz X-Ray difraksiyonu

1. GİRİŞ

Lennox-Gastaut sendromu (LGS), 1-7 yaş arasında başlayan, %67-75 oranında semptomatik etiyojolojiye sahip, sık düşmelere yol açan tonik ve atonik nöbetler ile uyku sırasında görülen tonik nöbetlerin ve atipik absans tipi nöbetlerin karakteristik olduğu ve başka birçok nöbet tipinin ve status epileptikusun da olabildiği epileptik bir ensefalopatidir. LGS kognitif yıkıma yol açan, kötü prognozlu, tedaviye dirençli bir sendromdur. LGS tedavisinde çok sayıdaki nöbet tipine yönelik çeşitli antiepileptik ilaç (AEİ) kombinasyonları kullanılır. Ancak birçok LGS'li hasta bu tedavilere dirençlidir, bir nöbet tipine tedavide etkin olan bir AEİ, başka bir nöbet tipini kötüleştirebilir, politerapi ilaç yan etkilerini artırabilir, var olan komorbiditeyi artırabilir.

Rufinamit (CAS No: 106308-44-5) son yıllarda başarılı sonuçlar alınan, 4 yaşından büyük LGS'li hastalarda kullanılmak üzere 2004'te "yetim ilaç" statüsü kazanmış, Avrupa'da ocak 2007'de, Amerika'da kasım 2008'de aynı endikasyonda kullanımına izin verilmiş olan bir AEİ'dir. Rufinamit, sodyum kanalının inaktivasyondan kurtulmasını yavaşlatır ve sodyum bağımlı aksiyon potansiyellerinin uzamış tekrarlanan nöronal ateşlenmesini kısıtlar.

Rufinamit pH'dan bağımsız olarak suda çözünürlüğü düşük olan BCS Class II grubundan bir etkin maddedir. Düşük çözünürlüğünden dolayı 200 mg ile 1200 mg dozları arasında non-lineer farmakokinetik gösterir ve bu nedenle terapötik dozu çok yüksektir (3200 mg). Türkiye'de tedarik edilebilen referans ürün Inovelon Süspansiyon (40mg/mL, 460 mL şişe/kutu) ve Inovelon Film Tablet (200 mg/50 tablet/kutu ve 400 mg/60 tablet/kutu) (Eisai Ltd. İngiltere) olup 2014 yılından itibaren Yurtdışı ilaç listesindedir ve TEB aracılığıyla getirilmektedir. Dozlamada hasta kilosu çok önemlidir. Bu anlamda kişiye özgü ilaç üretiminde eklemeli üretim tekniğinin büyük faydası olacaktır.

Eklemeli üretim, bitmiş ürünün dijital olarak tasarlandığı ve tabakalar halinde basıldığı yeni bir üretim yöntemidir. Uzun yıllardır kullanılan geleneksel tablet baskı tekniklerine göre, özellikle dar terapötik indeksi olan ürünlerde, proses kapasitesi ve üretim esnekliği yönlerinden oldukça büyük üstünlükler sağlamaktadır. Özellikle kişiye özgü tedavide büyük üstünlük taşımaktadır. İlaç araştırma ve geliştirme çalışmalarında en çok kullanılan yöntem filament üretimi ile ekstrüzyon olmaktadır. Yöntem aynı zamanda "Fused Deposition Modelling (FDM)" olarak da isimlendirilmekte olup 1980 yıllarında ortaya çıkmış ve ilk

üretim cihazları 1990 yıllarında markete girmiştir. Bu yöntemde kullanılan filament hammaddeleri termoplastik, biyolojik olarak uyumlu ve biyoparçalanabilir özellikte olmakta ve farklı özelliklerde salım yapan katı ilaçların geliştirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. FDM, sıcaklık yardımıyla oluşturulan bir katı dispersiyon tekniğidir. Katı dispersiyonlar etkin maddelerin çözünürlüğünü artırmak için sıklıkla ve başarıyla kullanılan bir farmasötik üretim yöntemidir.

“Nadir Hastalıklar”, genel nüfusa kıyasla az sayıda insanda görülen hastalıklar ve bu hastalıkların nadir olarak görülmesiyle ilgili olarak ortaya çıkan belirli sorunlardır. “Yetim İlaçlar” nadir hastalıklara yönelik olduğundan, pazar hacmi küçük ve Ar-Ge harcamaları yüksek ilaçlar olduklarından, normal pazarlama koşullarında ilaç endüstrisinin geliştirme konusunda isteksiz olduğu ilaçlardır. Bu nedenle bu hastalıklara sahip pek çok insan ilaca ulaşmakta ciddi zorluklar yaşamaktadır. Bu anlamda düşük hacimde üretim yapmaya uygun eklemeli üretim yönteminin, yetim ilaç üretimine çok ciddi katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Eklemeli üretim yapan sistemler maliyet olarak ölçek küçültme yatırımının çok altında kalacak olup masaüstü boyutlarıyla GMP koşullarında rahatlıkla kullanılabilecek sistemlerdir. Bu sayede eklemeli üretim yöntemi ile yetim ilaç üretiminin ön plana çıkması, dolayısıyla nadir hastalıklara sahip hastaların yetim ilaçlara daha kolay ulaşabilmesi hedeflenmektedir.

Gerçekleştirilen formülasyon geliştirme çalışmaları ile çözünürlüğü çok düşük ve terapötik dozu çok yüksek olan rufinamit etkin maddesi için çözünme davranışı piyasa ürününe göre belirgin derecede hızlandırılmış 3DP tablet formüllerinin hazırlanması amaçlanmıştır. Çözünme davranışı hızlandırılmış 3DP tabletlerle daha düşük dozlarda aynı etkinin sağlanması, bununla birlikte yan etkilerin azaltılması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nadir Hastalıklar

“Nadir Hastalıklar”, genel nüfusa kıyasla az sayıda insanda görülen hastalıklardır. Bir hastalık bir bölgede nadir görülürken başka bir bölgede sık görülebilir. Örneğin, genetik kökenli bir anemi olan “talasemi” Kuzey Avrupa’da nadir iken Akdeniz bölgesinde yaygındır (Orphanet, 2020b).

Bir hastalığın nadir olarak tanımlanabilmesi ülkeler arasında aşağıdaki gibi farklılıklar gösterebilmektedir:

- Amerika Birleşik Devletleri’ne göre nadir hastalıklar, Amerika Birleşik Devletleri toplam nüfusunda 200.000 kişinin altında gözlenen hastalıklardır (1/1500 insan) (FDA, 2002).
- Japonya’da nadir hastalıklar, Japonya’da yaşayan toplam nüfusta maksimum 50.000 kişinin etkilendiği hastalıklardır (1/2500 insan) (Orphanet, 2020a).
- Avrupa Birliği, nadir hastalıkları diğer ülkelerdeki gibi sadece prevalans değil, “yaşamı tehdit eden, ciddi derecede kronik engel yaratan ve düşük prevalansa sahip (1/2000 insan) hastalıklar” olarak tanımlamakta olup sadece düşük prevalansa sahip ancak yaşamı tehdit etmeyen hastalıklar bu kapsamın dışında tutulmuştur. Avrupa’da 30 milyon insanın nadir hastalıklardan etkilendiği rapor edilmiştir (EMA, 2020b).

Avrupa Sağlık Ajansına (EMA) göre nadir hastalıklar aşağıdaki şekilde özetlenmektedir (EMA, 2020b):

- Nadir hastalık sayısı 5000-8000 arasında olup Avrupa’da popülasyonun yaklaşık %6 - %8’ini etkilemektedir (27 milyon – 36 Milyon insan). Pek çok hasta 100.000’de 1 görülen hastalıklardan etkilenmektedir.
- Nadir hastalıkların yaklaşık % 80’i genetik kaynaklı olup dejeneratif ya da proliferatif türevleri de mevcuttur.
- Nadir hastalıklarda semptomlar çoğunlukla doğumda ya da çocukluk döneminde ortaya çıkabilmektedir (örn. spinal musküler atrofi, lisosomal storage disorders, patent ductus arteriosus, kistik fibrozis, renal hücre kanseri, gliom, akut miyelid lösemi, nörofibromatoz, cam kemik hastalığı, kondrodisplazi veya Rett sendromu).

- Bununla birlikte pek çok nadir hastalık (örn. Huntingon hastalığı, Crohn hastalığı, Charcot-Marie-Tooth hastalığı, amiyotrofik lateral skleroz, Kaposi sarkomu veya tiroid kanseri) erişkinlik döneminde ortaya çıkmaktadır (Orphanet, 2020b).
- Nadir hastalıklar hakkında yeterli tıbbi ve bilimsel bilgi mevcut değildir. Nadir hastalıklar üzerinde yapılan bilimsel çalışmalar her gün artmaktadır (ortalama 5 yeni hastalık/hafta). Buna rağmen yaklaşık 1000 nadir hastalık yetersiz bilimsel altyapı ile tedavi edilmektedir.

Çoğu nadir hastalık için hastalığı tamamen iyileştiren bir tedavi bulunmamaktadır. Ancak uygun tedavi ve tıbbi bakım hastaların hayat kalitesini artırabilir ve beklenen yaşam sürelerini uzatabilir. Bu tür hastalıklardan etkilenenlerin tümü, teşhis sürecinin yanında ilgili bilgi ve kalifiye uzmanlara yönlendirilme konusunda zorluklarla karşılaşmaktadır.

Nadir hastalıklardan etkilenen hastalar aynı zamanda psikolojik, sosyal, ekonomik ve kültürel açıdan daha zayıf durumdadır. Yeterli düzeyde bilimsel ve tıbbi bilginin mevcut olmamasından dolayı birçok hastaya teşhis konamamaktadır. Bunlar, uygun tedaviyi alma konusunda en çok güçlük yaşayan kişilerdir.

2.2. Yetim İlaçlar

“Yetim İlaçlar”, nadir hastalıkların tedavilerinde kullanılan, pazar hacmi küçük ve araştırma-geliştirme (Ar-Ge) harcamaları yüksek ilaçlardır. Bu nedenle mevcut pazarlama koşullarında ilaç endüstrisi, bu ilaçları geliştirme ve üretme konusunda isteksizdir. Sonuç olarak bu hastalıklara sahip pek çok insan ilaca ulaşmakta ciddi zorluklar yaşamaktadır.

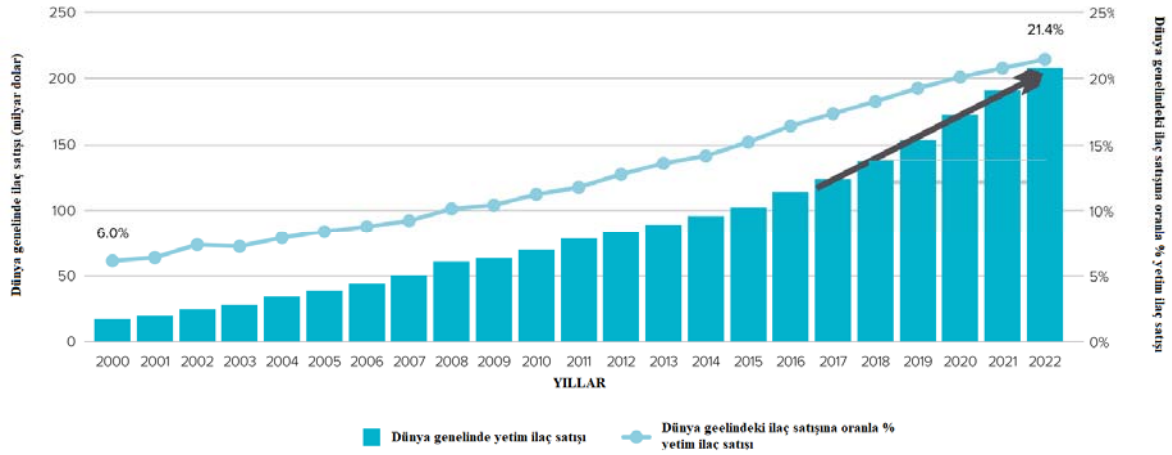
Kamu yetkilileri, yetim ilaç sektöründeki Ar-Ge çalışmalarını desteklemek amacıyla sağlık ve biyoteknoloji endüstrileri için teşvik tedbirlerini uygulamaya koymuştur. Bu doğrultuda Avrupa Parlamentosu ve Avrupa Konseyi tarafından “Yetim tıbbi ürünler (EC, 2000)” ve “Yetim ilaçlarda benzer tıbbi ürünler ve klinik üstünlük” kavramlarını tanımlayan yönetmelikler (EC, 2020) yayımlanmıştır. İlaveten Avrupa ilaç ajansı (EMA), yetim ilaç başvurularında bilimsel destek, market üstünlüğü, düşük başvuru ücreti gibi teşviklerin yapılacağını ifade etmektedir (EMA, 2020b).

Nadir hastalıklara yakalanan az sayıda hastanın kullandığı ilaçlara erişim zorluğu sonucunda ülkemizde de pek çok ölüm yaşanmaktadır. 2017 yılında Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, nadir hastalıklara yakalanan Türkiye’deki yaklaşık 7 milyon hasta için “Yetim İlaçlar Kılavuz Taslağı” çalışmalarını başlatmıştır. Türkiye’de 10.000 kişide en fazla 5 hastanın bulunduğu, yaşamı tehdit eden, ciddi derecede engellilik yaratan ve yüksek Ar-Ge maliyetine sahip beşeri tıbbi ürünler bu kılavuzun kapsamındadır. Yetim ilaç ruhsatlarının en kısa sürede çıkarılması, GMP süreçlerinin hızlandırılması, ruhsat ücretinin 10’da birinin alınması ve yetim ilaç tanımlama başvurularından ücret alınmaması düşünülen teşvikler arasındadır (Aksungur, 2017).

Bununla birlikte kıtalararası pazarlama istatistikleri (Intercontinental marketing statistics, IMS) raporları incelendiğinde 2018 yılında dünyada toplam ilaç harcamalarının % 30 artacağı, ancak mevcut ürünlerin çoğunun patent sürelerinin dolacak olması nedeniyle firmaların kişiye özel ve yetim ilaçlara yöneleceği, bu sayede bu ilaçların değer kazanacağı ve ulaşılabilirliğinin artacağı öngörülmektedir (Aitken, 2014).

“European Pharmaceutical Review” dergisinde 2017 yılında yayımlanan verilere göre İngiltere ilaç pazarında 68, Fransa’da 116 ve Almanya’da 133 adet yetim ilaç bulunmaktadır (Kassam, 2017). Koçkaya ve ark. yaptığı çalışmada Türkiye’de 2010 yılında 50 adet yetim ilaç pazara girmiş, bu ilaçların %58’inin antineoplastikler olduğu ve yaklaşık 120 milyon Euro’luk bir pazarı olduğu belirtilmiştir (Koçkaya ve diğerleri, 2014).

2017 yılında yayımlanan bir rapora göre 2022 yılında dünya genelinde yetim ilaç satışlarının ~%11 artarak dünya genelindeki toplam ilaçların ciro bazında ~%21’inin yetim ilaçlardan oluşacağı öngörülmektedir (Şekil 2.1) (EvaluatePharma, 2017).



Şekil 2.1. Dünya genelinde yetim ilaç satışı ve genel ilaç satışındaki oranı

Bununla birlikte yetim ilaç üretiminin endüstri açısından zorlukları bulunmaktadır. Yetim ilaçları kullanacak hasta sayısının az olması nedeniyle kar marjı ve üretim şarjı düşük olmakta, her ne kadar otorite tarafından farklı desteklerle teşvik edilse de firmaların ölçek küçültme esnasında ciddi ekipman yatırımı yapması gerekmektedir.

Bu anlamda düşük hacimde üretim yapmaya uygun eklemeli üretim yönteminin, yetim ilaç üretimine çok ciddi katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Eklemeli üretim yapan sistemler maliyet olarak ölçek küçültme yatırımının çok altında kalacak olup masaüstü boyutlarıyla GMP koşullarında rahatlıkla kullanılacak sistemlerdir. Bu sayede eklemeli üretim yöntemi ile yetim ilaç üretiminin ön plana çıkması, dolayısıyla nadir hastalıklara sahip hastaların yetim ilaçlara daha kolay ulaşabilmesi hedeflenmektedir.

2.3. Kişiselleştirilmiş Tedavi

Kişiselleştirilmiş tedavi, doğru dozda doğru ilacın hastaya özel olarak belirlenmesi ve uygulanmasıdır. Hipokrat'ın da öğrencilerine tavsiyesi “Hastalığı değil hastayı tedavi et.” şeklinde olmuştur (Alomari, Mohamed, Basit ve Gaisford, 2015).

Geleneksel üretim yönteminde, büyük şarjlarda ve erken klinik çalışmalar esnasında belirlenen sabit dozlarda üretim yapılmaktadır. Kişiselleştirilmiş ve çok küçük şarjlarda üretim yapmak, mevcut ekipmanlarla mümkün olmamakta, bu üretimler için özel ekipman yatırımlarının yapılması gerekmektedir. Bu nedenle endüstride üretimi sınırlıdır.

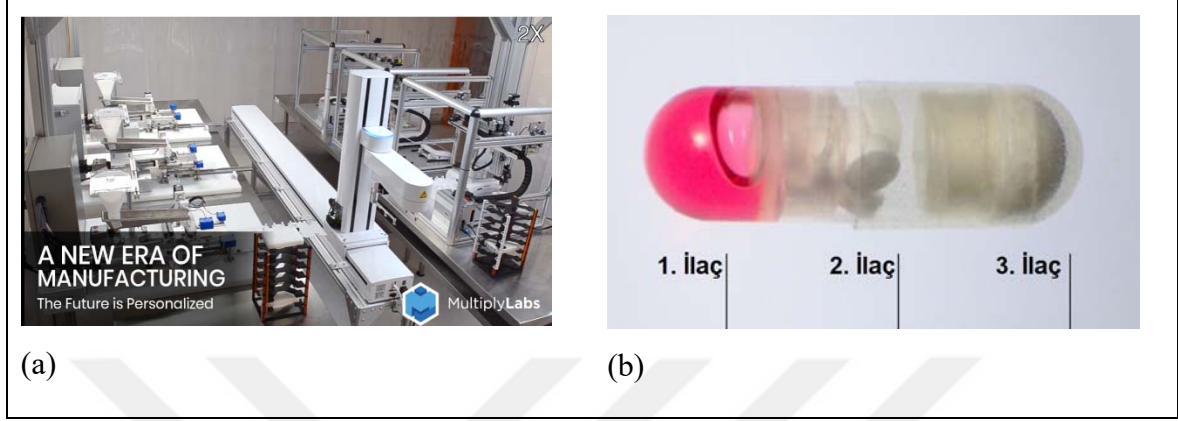
Kişiselleştirilmiş tedaviye uygun olarak üretilmeyen bazı ilaçlara ait yaşanan zorluklar aşağıdaki gibi özetlenmiştir.

- Fluoksetin (Prozac®): Ticari piyasa preparatı 20 mg dozda etkin madde içermektedir ve bu hedef popülasyonun %64'ü için yeterli olmaktadır. Bununla birlikte popülasyonun %54'ünde 5 mg'ın da etkinliğinin yeterli olduğu ve daha az yan etkileri olması nedeniyle daha iyi bir tedavi sağlandığı bilinmektedir (Alomari ve diğerleri, 2015).
- Zolpidem: Mevcut üretimi 5 mg dozda yapılmaktadır ve etkinliği yeterli gelmediği için tedavide 10 mg dozda kullanılmakta, bu da yan etkilerde artışa neden olmaktadır. Aslında 7,5 mg doz ile etkin tedavi sağlanabilecek iken mevcut piyasa dozu olmadığı için tedavi 5 mg ve 10 mg dozlarla devam ettirilmektedir (Alomari ve diğerleri, 2015).
- Kanser Tedavisi: Kanser hastalıklarında hastalığın aşaması hastadan hastaya değişmekte ve tedavi dozunun buna uygun olarak belirlenmesi gerekmektedir. Pek çok ilaç bu amaçla doz ayarlamasında yeterli olamamaktadır. Kişiselleştirilmiş dozlarda üretim, daha az yan etki ile daha etkin tedavinin sağlanmasına olanak vermektedir (Varan, Wickström, Sandler, Aktaş ve Bilensoy, 2017).
- Pediatrik ve Geriatrik Hastalar: Hem pediatrik hem de yaşlı hastalarda yaş, kilo, metabolik fonksiyonlar açısından GI sistem fizyolojik olarak yetişkin insanlardan farklı olmaktadır. Örneğin geriatrik hastalarda çok fazla ilaç kullanımına bağlı bazı metabolik değişiklikler olabilmektedir. Geriatrik hastalara ilave bir ilaç daha verilirken bu sebeple doz ayarlamasının çok hassas bir şekilde yapılması gerekmektedir (Alomari ve diğerleri, 2015).

Günümüzde doz ayarlaması katı ilaç şekillerinde, özellikle tabletlerde çentikten bölme şeklinde yapılırsa da ilacı birebir eşit iki parça halinde bölmek zor olmaktadır. Sıvı ilaç şekilleri için kaşık, enjektör vb. ile hacmen doz ayarlaması yapılabilmektedir. Fakat hacmin bilinçli bir kişi tarafından ayarlanması gerekmesi ve hastanın kullanımına bağlı olması nedeniyle hatalı dozlamalara neden olabilmektedir (Alomari ve diğerleri, 2015).

Bu bilgiler ışığında eklemeli üretim teknolojisinin, kişiye özgü ilaçların üretiminde çok faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Bu amaçla kurulmuş Multiply Labs isimli firma, robotik üretim sistemleri sayesinde birden fazla etkin maddeyi özel dozlarda bir araya getirerek kişiselleştirilmiş ilaçları üretebilmektedir (Şekil 2.2) (Parietti, 2019).



Şekil 2.2. Kişiselleştirilmiş ilaç üretim yöntemi (a) Üretim alanı: (b) Üç farklı ilaç içeren kişiselleştirilmiş ilaç

2.4. Epilepsi

Epilepsi, tekrarlayan çeşitli nöbetlerle görülen ve bu nöbetlerin nedeninin serebral nöronların ani, düzensiz ve aşırı uyarılarının olduğu bir hastalıktır. Oluşan belirtiler uyarıların çıkış bölgesine göre değişir. Örneğin uyarılar motor korteksten çıkıyorsa epilepsi nöbeti konvülziyonlar şeklinde olabilir. Uyarılar parietal veya oksipial kortekslerden kaynaklanıyorsa nöbetler görsel, işitsel veya olfaktör halüsinasyonlar şeklinde olabilir (Howland ve Mycek, 2009).

2.4.1. Nedenlerine göre epilepsi türleri

Epilepsideki nöronların deşarjı, beynin esas odak olarak adlandırılan özel bir bölgesindeki sayıca az bir nöron topluluğunun ateşlenmesinden kaynaklanır. Kan gazları, pH, elektrolitler veya kan glukoz derişimindeki değişiklikler gibi etkenlerin, işlevsel olarak anormal olan fokal alanlarda, nöronların deşarjlarını tetikledikleri bilinmesine rağmen genellikle epilepsinin nedeni saptanamaz. Bununla birlikte “Primer Epilepsi” ve “Sekonder Epilepsi” olmak üzere aşağıdaki şekilde iki grup halinde incelenebilirler (Howland ve Mycek, 2009).

1. *Primer Epilepsi*: Travma ve neoplazi gibi nöbete neden olabilecek anatomik bir nedenin olmadığı durumlar, idiyopatik veya primer epilepsi olarak adlandırılır. Bu hastalar antineoplastik ilaçlarla kronik olarak sıklıkla ömür boyu tedavi edilir.
2. *Sekonder Epilepsi*: Tümör, kafa travması, hipoglisemi, menenjit ve alkoliklerin alkolü çok hızlı bırakmaları gibi çeşitli nedenlere bağlı olarak ortaya çıkabilir. Nöbetlerin esas sebebi ortadan kalkıncaya kadar antiepileptik ilaçlarla tedaviye devam edilir. Serebrovasküler olaylar ve travmaya ikincil olan nöbetler santral sinir sisteminde kalıcı hasara yol açabilirler.

2.4.2. Nöbet tipine göre epilepsi türleri

Nöbetler parsiyal (kısmi, fokal) ve jeneralize (yaygın) olmak üzere Çizelge 2.1’de sunulduğu gibi iki ana gruba ayrılırlar (Howland ve Mycek, 2009).

Çizelge 2.1. Nöbet tipine göre epilepsi türleri

Parsiyel (Kısmi, fokal) (Bilinç korunur)	Jeneralize (Yaygın) (Bilinç yoktur)
• Basit (normal bilinç) • Kompleks (bilinç değişikliği)	• Tonik-klonik (grand-mal) • Absan (petit mal) • Myoklonik • Çocuklarda febril konvülsiyon • Status epileptikus

1. Parsiyel (Kısmi, Fokal): Her bir nöbet tipinin belirtileri, uyarının kaynağına ve elektriksel aktivitenin beyindeki diğer nöronlara ne derecede yayıldığına bağlıdır. Parsiyel nöbetler yayılarak jeneralize tonik-klonik nöbetlere dönüşebilir.
 - a. Basit Parsiyel: Bu nöbetler bir grup anormal elektriksel aktivite gösteren hiperaktif bir nöron grubu tarafından oluşturulurlar ve beynin sadece bir bölgesinde sınırlıdır. Elektriksel uyarılar beynin diğer bölgelerine yayılmazlar. Hastalarda bilinç kaybı görülmez ve genellikle beynin etkilenen bölgesinin kontrol ettiği tek bir ekstremita veya kas grubunda istemsiz hareketler ortaya çıkar. Hastada aynı zamanda duyu bozuklukları görülebilir. Basit parsiyel nöbetler her yaşta ortaya çıkabilir.
 - b. Kompleks Parsiyel: Bu nöbetler karmaşık duyu halüsinasyonlar, zihinsel işlevlerde bozulma ve bilinç kaybıyla kendini gösterir. Motor bozukluk, çiğneme hareketi, ishal

ve/veya idrar kaçırma şeklinde olabilir. Kompleks parsiyel epilepsi görülen hastaların %80'inde ilk nöbet 20 yaşından önce ortaya çıkar.

2. Jeneralize: Bu nöbetler bir bölgeden başlarlar ancak hızla yayılarak beynin her iki hemisferinde de elektriksel uyarılara neden olurlar. Jeneralize nöbetler konvülsif veya nonkonvülsif olabilirler. Hastalarda genellikle ani bilinç kaybı olur.
- a. Tonik-klonik (grand mal) Nöbetler: Bu epilepsinin en sık ve en ağır formudur. Nöbetler bilinç kaybına neden olurlar ve bunu tonik (sürekli kasılma) ve klonik (birden olan kontraksiyon ve rahatlama) safhaları takip eder. Nöbet geçtikten sonra enerji depolarının tükenmesi nedeni ile hastalarda konfüzyon ve aşırı yorgunluk şeklinde bir dönem yaşanır.
- b. Absans (petit mal) Nöbetler: Bu nöbetlerde kısa, ani ve kendini sınırlayan bir bilinç kaybı görülür. Nöbetlerin başlangıç yaşı 3-5 yaşlarından puberteye kadar olan dönemdir. Hastalarda 3-5 saniye kadar süren bir noktaya bakma ve hızlı göz kırpmaya hareketleri görülür.
- c. Myoklonik Nöbetler: Bu nöbetler birkaç dakikada bir tekrarlayabilen kısa süreli kasılmalarından oluşurlar. Myoklonik nöbetler nadirdir, her yaşta görülebilir ve genellikle hipoksi, üremi, ensefalit veya ilaç zehirlenmesi gibi durumlara bağlı kalıcı nörolojik hasar sonucunda ortaya çıkarlar.
- d. Febril Nöbetler: Küçük çocuklarda (3 aydan 5 yaşa kadar) ateşli hastalık dönemlerinde sık görülür. Febril nöbetler şiddetli gibi görünseler de zararsızdırlar ve ölüme, nörolojik hasara ve öğrenme güçlüğüne neden olmazlar. Nadiren ilaç tedavisi uygulanması gerekir.
- e. Status Epileptikus: Nöbetler çok hızlı olarak tekrarlar.

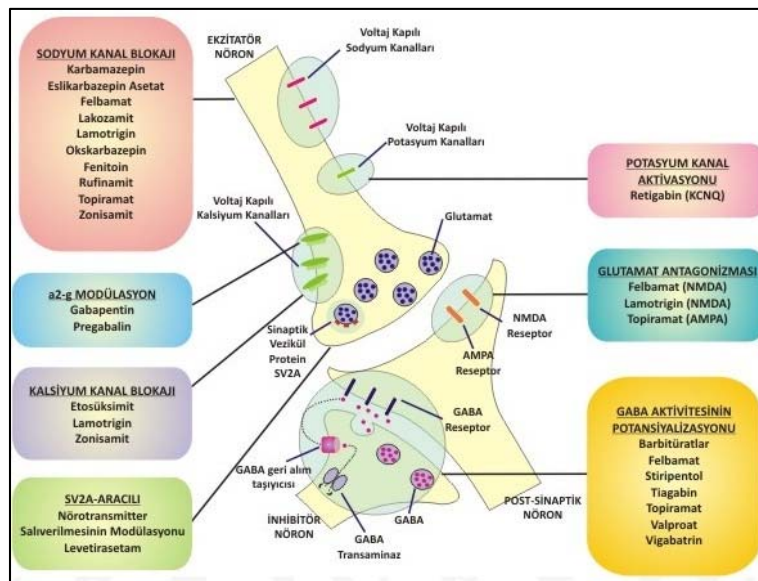
2.4.3. Antiepileptik ilaçların etki mekanizması

Nöbetlerin kontrolünde etkili olan ilaçlar ya belli bir alandan çıkan uyarıları baskırlar ya da daha sıklıkla anormal elektrik deşarjının beynin diğer bölgelerine yayılımını engellerler. Bunu voltaja bağımlı kanalların blokajı (Na^+ ya da Ca^{+2}), inhibitör GABAerjik uyarıların tetiklenmesi, veya eksitator glutamaterjik iletimin engellenmesi gibi çeşitli mekanizmalar ile başarırlar. Antiepileptik ilaçlar (AEİ) özet olarak Çizelge 2.2'de gösterilmektedir (Howland ve Mycek, 2009). Çeşitli epilepsi türlerinin tedavisinde kullanılan antikonvülzan ilaçların etki mekanizmaları Şekil 2.3'te (RxMediaPharma, 2020), endikasyonları Şekil 2.4'te (Howland ve Mycek, 2009) sunulmuştur.

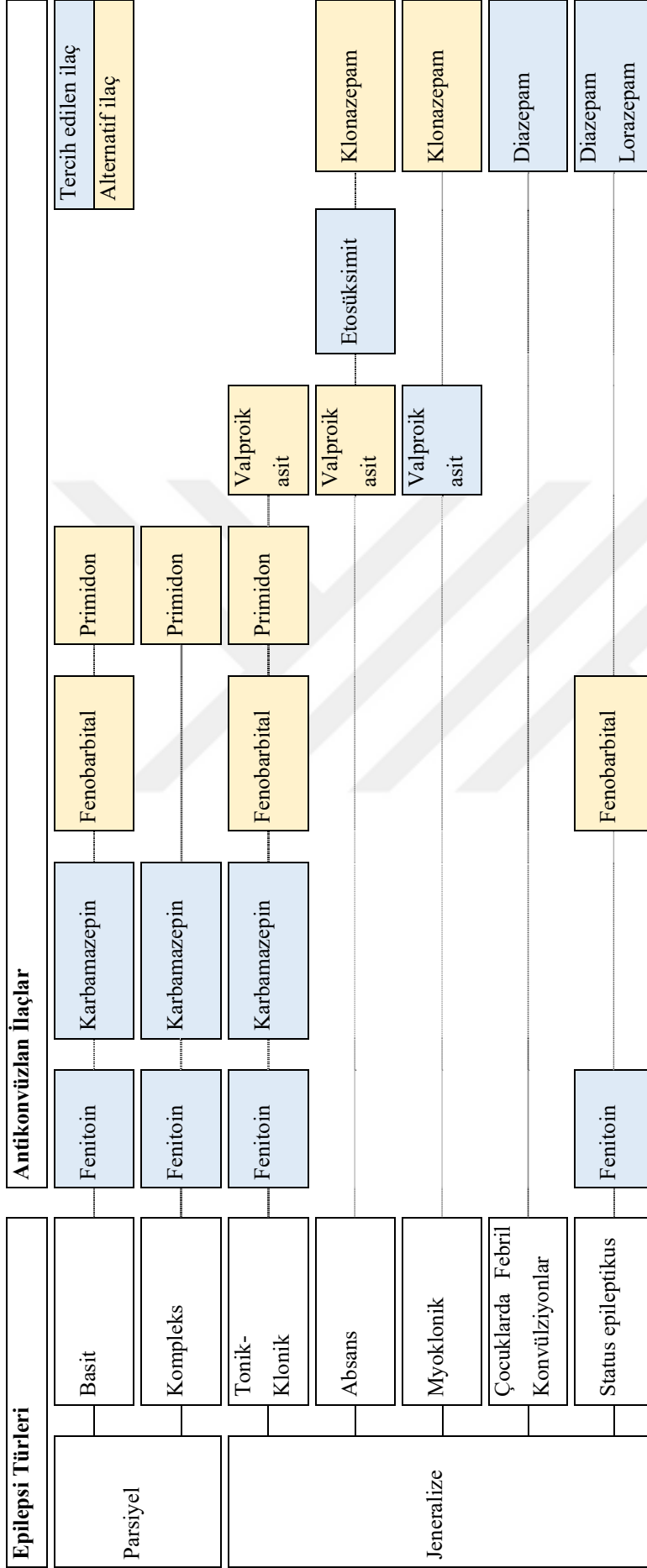
Çizelge 2.2. Antiepileptik ilaçlar

Primer ilaçlar	Ek ilaçlar
- Karbamazepin - Klonazepam - Klorazepat - Diazepam - Etosüksinimit - Lorazepam	- Okskarbazepin - Fenobarbital - Fenitoin - Pirimidon - Valproik asit - Felbamat - Gabapentin - Lamotrijin - Levetirasetam - Tiagabin - Topiramet - Zonisamid

1. Primer Antiepileptik İlaçlar: Nöbetleri baskılamak veya sıklığını azaltmak amacıyla seçilecek olan başlangıç tedavisi nöbet tipine göre belirlenir. Bu nedenle tonik-klonik nöbetler absans nöbetlerinden daha farklı tedavi edilirler. Çeşitli ilaçlar aynı etkinlikte olabilir ve ilaç seçiminde ilacın toksisitesi önemli rol oynar. Nöbetler kontrol altına alınmıyorsa veya ilacın toksik etkileri ortaya çıkıncaya kadar tek bir ilaçla tedaviye devam edilir. Kombine ilaç tedavisi alan hastalarla karşılaştırıldığında, tek ilaç alanlarda uyumun daha iyi olduğu ve daha az yan etki görüldüğü izlenmiştir.
2. Ek Tedavide Kullanılan Antiepileptik İlaçlar: Geçtiğimiz 10 yıl içerisinde geliştirilmiş ve dirençli epilepsilerde ek tedavi olarak etkili oldukları kanıtlanmış ilaçlardır. Birçoğu tek ilaç tedavisinde de etkilidir.



Şekil 2.3. Çeşitli antikonvülzan ilaçların etki mekanizmaları (RxMediaPharma, 2020)



Şekil 2.4. Çeşitli epilepsi türlerinin tedavisinde kullanılan antikonvüzan ilaçların endikasyonları

2.5. Lennox-Gastaut Sendromu (LGS)

LGS 1-7 yaş arasında başlayan, genellikle 3 ila 5 yaşları arasında gözlenen, %67-75 oranında semptomatik etiyolojiye sahip, sık düşmelere yol açan, çok çeşitli nöbet tipinin birlikte gözleendiği epileptik bir ensefalopatidir (Atmaca, Baykan, Bebek, Gürses ve Gökyiğit, 2012) (EMA, 2007b) (Epilepsyfoundation, 2020).

LGS geri dönüşsüz kognitif yıkıma yol açar, öğrenme geriliği yaratır, hiperaktivite, agresiflik ve otizm gibi davranışsal problemlere sebep olur (Epilepsyfoundation, 2020).

Çocukluk dönemi epilepsi olgularının %2-%5'ini oluşturur. Irka bağılı bir yatkınlık gözlenmemiştir fakat erkek çocuklarda bir miktar daha sık görülür (Epilepsyfoundation, 2020) (Medscape, 2020) (NIH, 2020) (Campos-Castelló, 2004). Erkeklerde prevalans 0,1/1000 iken kız çocuklarında bu oran 0,02/1000 çocuktur (Medscape, 2020). İlk belirtiler genellikle 2 yaşından önce görülür (Medscape, 2020).

Epidemiyolojik çalışmalara göre LGS'nin Avrupa'daki prevalansı 0,1-0,28/1000 kişi (van Rijckevorsel, 2008). Amerika Birleşik Devletlerindeki prevalansı 0,26/1000 kişidir (McCormack, 2012) . Ölüm oranı %3-%7 arasında olup genellikle atonik ve/veya tonik nöbetler esnasında yaşanan düşme ve kazalar nedeniyledir. (Medscape, 2020). Bu nedenle LGS hastalığına sahip çocukların kask kullanmaları önerilmektedir (Webmd, 2020).

Gözlenen nöbet tipleri aşağıdaki gibidir (Medscape, 2020) (Webmd, 2020):

- Tonik nöbetler (frekansı %17-%95) Uykuda ya da uyanık gözlenebilir.
- Absans nöbetler (frekansı %17-%100): Kademeli olarak gelişebilir, bilinç kaybına neden olabilir.
- Atonik, myoklinik nöbetler (frekansı %10-%56): Ani düşmelere neden olabilir.
- Diğer nöbet tipleri (frekansı %5-%15)

Teşhisinde aşağıdaki üç önemli faktör rol oynamaktadır (Epilepsyfoundation, 2020) (NIH, 2020) (Kothare ve diğerleri, 2017):

1. Çok çeşitli nöbet tipinin birlikte görülmesi: Tonik, atonik, absans, myoklonik, tonik-klonik nöbetler görüntülenir.

2. Karakteristik elektroensefalograf (EEG): Uyanıklıkta yaygın arka plan ve yavaş dalgalanmalar. Uyku anında, karakteristik “generalized slow spike-and-wave, (SSW)” görünümü (Şekil 2.5) (Garza ve diğerleri, 2019).
3. Kognitif hasar, davranış problemleri, gelişim geriliği: Çocukların %70-80’inde gelişim geriliği ve nörolojik problemler gözlenir ve bu problemler zamanla artar. On yaşındaki LGS hastaları üzerinde yapılan bir çalışmada hastaların %17’sinde mental gerileme (IQ <20) ve pek çok hastada diğer yetersizlikler (serebral palsy, körlük, işitme kaybı) gözlenmiştir. Bu nedenle hastaların çoğu bağımsız bir hayat sürdüremezler (McCormack, 2012).



Şekil 2.5. 24 yaşında uyanık erkek LGS hastasına ait SSW görünümünde EEG

LGS’ye sebep olabilecek sebepler aşağıdaki şekilde üç grup halinde incelenmektedir (Epilepsyfoundation, 2020) (NIH, 2020):

1. Yapısal faktörler: Konjenital (doğuştan) ya da sonradan meydana gelen beyin hasarları sonucu beyin yapısında gelişebilecek anormalliklere bağlı gelişebilir. Doğuştan oluşan yapısal anormalliklerin sebebi genellikle bilinmemekle birlikte genetik ya da hamilelik dönemindeki enfeksiyona bağlı olabilir. Sonradan meydana gelen beyin hasarları yetersiz oksijen, beyin kanaması, menenjit ya da ensefalit gibi hastalıklar nedeniyle olabilir.
2. Genetik bozukluklar: LGS'ye sebep olabilecek faktörlerin en başında gelmektedir.
3. Metabolik bozukluklar: LGS'ye nadiren sebep olan bir faktördür.

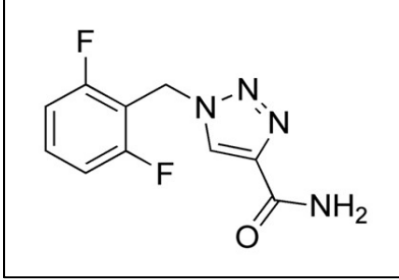
LGS kötü prognozlu ve tedaviye dirençli bir sendromdur (Atmaca ve diğerleri, 2012) (EMA, 2007b). Tedavide ilk aşamada nöbet önleyici ilaçlar kullanılır (özellikle klonazepam, nitrazepam, klobazam) (Medscape, 2020). Etkinliği ispat edilmiş yeni ilaçlar da tedaviye girmiştir (lamotrijin, topiramit, felbamat, rufinamit, kannabidiol). Bununla birlikte etkinliği ispat edilmemiş vigabatrin ve zonisamit kullanımı da bulunmaktadır (Medscape, 2020). LGS tedavisinde çok sayıdaki nöbet tipine yönelik çeşitli antiepileptik ilaç (AEİ) kombinasyonları birlikte kullanılmaktadır. Ancak bir nöbet tipinde etkin olan bir AEİ, başka bir nöbet tipini kötüleştirebilir. Politerapi ilaç yan etkilerini ve var olan komorbiditeyi artırabilir. Bu nedenlerle mevcut tedavi yöntemlerinde başarı oranı çok düşüktür (Kim, Kang, Lee ve Kim, 2018) (EMA, 2007a). Bunlarla birlikte tedavide ketojenik diyet, düşük glisemik indeksli beslenme ve modifiye atkins diyeti de uygulanabilmektedir (Epilepsyfoundation, 2020) (Medscape, 2020). İlaveten çok düşük bir oranda hastada “Corpus callosotomy” ve “fokal kortikal reseksiyon” gibi beyin ameliyatları ile “Vagus nerve stimulation (VNS)” gibi beyin implantları kullanılabilmektedir (Epilepsyfoundation, 2020) (Medscape, 2020).

2.6. Rufinamit

Rufinamit, piyasada epilepsi tedavisinde kullanılan diğer AEİ'lerden farklı bir kimyasal yapıya sahip, triazol türevi bir AEİ'dir (Wier, Cerna ve So, 2011). Avrupa komisyonu ve Amerika Birleşik Devletleri tarafından 2004'te Lennox-Gastaut sendromunun tedavisinde yetim ilaç olarak kullanımı kabul edilmiştir (EMA, 2007b) (FDA, 2020b). Erken klinik çalışmalar, Avrupa'da 1987 yılında Ciba-Geigy firması tarafından başlatılmıştır. Geliştirme çalışmaları, Ciba-Geigy ve Sandoz firmalarının birleşmesi ile kurulan Novartis tarafından 2001 yılına kadar devam ettirilmiştir. 2004 yılında Eisai Novartis'ten tüm geliştirme haklarını satın almış ve bundan sonraki çalışmalar Eisai tarafından gerçekleştirilmiştir (EMA, 2007a).

2.6.1. Fizikokimyasal özellikler

Rufinamit beyaz, kristalize, kokusuz ve hafif acı tadı olan nötral bir tozdur. Molekül yapısı Şekil 2.6 (FDA, 2008): fizikokimyasal özellikleri Çizelge 2.3'te sunulmuştur.



Şekil 2.6. Rufinamitin molekül yapısı

Polimorfizm

Rufinamit polimorfizm gösterir. A, A', B ve C kristal modifikasyonları Amerikan patent ofisinden yayımlanmış US8076362 B2 (Portman, Hoffmeier, Burkhard, Scherrer ve Szelagiewicz, 2011), US 6740669 B1 (Portman, Hoffmeier, Burkhard, Sherrer ve Szelagiewicz, 2004) ve US 7750028 B2 (Portman, Hofmeier, Burkhard, Scherrer ve szelagiewicz, 2010) patentlerinde tarif edilmiştir. Rekristalizasyon prosesi ve seçilen çözücü tipine göre farklı polimorfların elde edilebildiği belirtilmiştir. Özellikle A ve A' kristal modifikasyonları, yüksek stabiliteye sahip ve farmasötik etkin madde olmasını sağlamaktadır (Portman ve diğerleri, 2011; Portman ve diğerleri, 2004; Portman ve diğerleri, 2010).

Etki mekanizması

Rufinamitin antikonvülzan etki mekanizması henüz aydınlatılamamıştır. In-vitro veriler ilacın terapötik etkisini sodyum kanallarının modülasyonu aracılığıyla, başlıca kanalın inaktif halini uzatarak gösterdiğine işaret etmektedir. Rufinamit, sodyum kanalının inaktivasyondan kurtulmasını yavaşlatır ve sodyum bağımlı aksiyon potansiyellerinin uzamış tekrarlanan nöronal ateşlenmesini kısıtlar (RxMediaPharma, 2020) (Joseph, Schultz ve Wilfong, 2011) .

Çizelge 2.3. Rufinamitin fizikokimyasal özellikleri

	Özellik	Referans
CAS No	106308-44-5	(EMA, 2007a)
Molekül formülü	C ₁₀ H ₈ F ₂ N ₄ O	(EMA, 2007a)
Molekül ağırlığı	238.2 g/mol	(EMA, 2007a)
Kimyasal ismi	1-[(2,6-difluoro-phenyl) methyl]-1H-1,2,3-triazole-4 carboxamide [INN]	(Wheless ve Vazquez, 2010)
Çözünürlük	Pratik olarak suda çözünmez (40 mg/L). Metanolde kısmen (<i>partially</i>) çözünür. Etanolde hafif (<i>slightly</i>) çözünür.	(Mazzucchelli ve diğerleri, 2011)
	Çözünürlük sıralaması aşağıdaki gibidir: Su < İzopropil alkol < Etanol < Metanol < Kloroform < DMSO	(Wandera, 2013)
	pH 1 ile 10 arasında sudaki çözünürlüğü benzerdir.	(EMA, 2007a) (Perucca, Cloyd, Critchley ve Fuseau, 2008)
	0,1 N HCl'de 63 mg/L ve simüle edilmiş bağırsak ortamında 59 mg/L'dir.	(Mazzucchelli ve diğerleri, 2011)
Log P	0,65 (lipofilik)	(EMA, 2007a)
pKa	>10 (non iyonize)	(Dalvi, Uppuluri, Bommireddy ve Ravi, 2018)
Erime derecesi	230-240°C	(Singh ve diğerleri, 2013)
Stabilite	Alkali ve oksidasyon degradasyonu ile karşılaştırıldığında asidik ve termal degradasyona karşı oldukça dayanıklıdır.	(Annapurna, Goutam, Saketha ve Pavani, 2012)
	Katı numune 100°C'de 24 saat boyunca stabildir.	(Singh ve diğerleri, 2013)

Etkinlik

Rufinamitin etkinlik çalışması pivotal, 12 haftalık, randomize, çift körlü çalışma ile gösterilmiştir. 28 günlük tedavi sonrasında hem düşme nöbetleri hem de toplam nöbet sayısının plasebo grubuna göre $\geq$ % 50 azaldığı gözlenmiştir (McCormack, 2012). Ohtsuka ve ark. epileptik nöbet frekansının plasebo kontrol grubuna kıyasla rufinamit kullanımı ile anlamlı derecede azaldığını, tonik-atonik nöbetlerde %24.2 ve toplam nöbette %32.9 azaldığını yayımlamıştır ($p < 0,001$) (Ohtsuka ve diğerleri, 2014).

Tolerabilite

Rufinamit 1 yaşın üstündeki çocuklarda (Vendrame ve diğerleri, 2010) ve yetişkinlerde (Arzimanoglou ve diğerleri, 2016) LGS tedavisinde oral yoldan güvenle kullanılan bir AEİ'dir (Kim ve diğerleri, 2018). Toksisite davranışı mevcut AEİ'lerden daha üstündür (White ve diğerleri, 2008). Sıçan ve farelerde LD50 değeri > 5000mg/kg'dır (USP, 2011).

Yan etkileri hafif ya da orta seviyede seyreder. En sık gözlenen yan etkisi uyku hali ve kusmadır (≥ 10) (McCormack, 2012). Diğer bilinen yan etkileri baş dönmesi, yorgunluk ve bulantıdır (eMC, 2020). Epilepsi hastalarında AEİ terapisi sonrası meydana gelen kognitif bozukluklar genellikle geri dönüşsüz iken 200 mg- 1600 mg/gün dozda rufinamit ile tedavi edilen parsiyal nöbeti olan hastalarda 12 haftalık tedavi sonrasında kognitif bozukluk gözlenmemiştir (Deeks ve Scott, 2006). Rufinamitin karaciğer hasarına yol açtığını gösteren bir çalışma yoktur. Bununla birlikte 200 çocuk üzerinde yapılan bir çalışmada 2 çocukta karaciğer üzerindeki yan etkiler nedeniyle tedavi yarıda bırakılmıştır. İlâveten rufinamit “Stevens Johnson” sendromu gibi ciddi deri reaksiyonları ile ilişkilendirilmiştir. Bu sendromun karaciğer harabiyeti ile bağlantılı olması nedeniyle rufinamitin nadir de olsa karaciğer harabiyetine neden olabileceği raporlanmıştır (NIH, 2018).

Pozoloji

Rufinamit dozlamasının yavaş titrasyon şeklinde olması gerektiği literatürde belirtilmiştir (Kothare ve diğerleri, 2017). Bir yaş ve altındaki pediyatrik hastalarda genellikle 10 mg/kg/gün dozda oral olarak tedaviye başlanır, her iki günde bir hedef doz 45 mg/kg/gün oluncaya kadar 10 mg/kg/gün doz artışıyla titre edilir (Deeks ve Scott, 2006). Klinik cevap ve tolerabilite takip edilmelidir (eMC, 2020). Yetişkinlerde dozlama ise 400-800 mg/gün şeklinde oral yoldan başlanır ve iki günde bir artırılarak 3200 mg/gün seviyesine ulaştırılır (FDA, 2020a). Doz hem pediyatrik hem yetişkin hastalarda ikiye bölünerek alınır (maksimum doz: 3200 mg/gün) (FDA, 2020a). Güncel verilere göre 3200 mg doz hem maksimum hem de terapötik dozdur. Daha düşük dozlarda ilacın etkinliği hakkında veri bulunmamaktadır (FDA, 2020a). Çocuklarda dozlama kiloya bağlı olduğu için “kişiye özel” dozlama gerekmektedir. Bu nedenle gerekli dozu verebilecek tablet ağırlığının hastaya özel değişmesi gerekebilmektedir. 3DP üretim yönteminin en büyük üstünlüklerinden biri, “kişiye özel” ilaçların üretilebilmesidir. Bu nedenle 3DP yöntemi ile üretilecek rufinamit tabletlerin tedavide üstünlük sağlayacağı düşünülmektedir.

Miktar tayini analizi metotları

Literatürde rufinamitin farmasötik ilaç şeklinden ya da biyolojik ortamdan miktar tayini analizinin tarif edildiği pek çok metot bulunmakta olup en güncel HPLC yöntemleri Çizelge 2.4’te sunulmuştur.

Çizelge 2.4. Rufinamitin HPLC ile miktar tayini analiz yöntemleri

Kolon	Dalga Boyu	Mobil Faz	Akış Hızı	Kolon Sıc.	Enj. Hacmi	Çözücü	RT	Referans
C18, 5 µm, 250 x 4.60 mm	215 nm	10mM amonyum asetat tamponu (glasiyel asetik asit ile pH 4,7 ± 0,1'e ayarlanır) : ACN (84,7:15,3)	1,0 mL/dk	40 °C	50 µL	Mobil faz	~15 dk	(Dalvi ve diğerleri, 2018)
C18, 5 µm, 250 x 4.60 mm	293 nm	Tampon: ACN (60:40) (Tampon: 6,08 g/L KH ₂ PO ₄)	1,0 mL/dk	25 °C	20 µL	Mobil faz	~ 5 dk	(Singh ve diğerleri, 2013)
C18, 5 µm, 250 x 4.60 mm	215 nm	Tetrabütül amonyum hidrojen sülfat: ACN (50:50)	1,0 mL/dk	30 °C	20 µL	ACN	~ 4 dk	(Annapurna ve diğerleri, 2012)
C18, 5 µm, 125 x 4.60 mm	220 nm	MeOH : THF : Su (12:5:83)	1,0 mL/dk	25 °C	20 µL	MeOH: THF (50:50)	~ 7 dk	(USP, 2020a)
C18, 5 µm, 125 x 4.60 mm	210 nm	MeOH : THF : Tampon (15:5:80) (Tampon: 2,7 g/L KH ₂ PO ₄)	1,0 mL/dk	25 °C	25 µL	ACN: MeOH: Su (40:50:10)	~ 7 dk	(USP, 2020b)
C18, 5 µm, 250 x 4.60 mm	215 nm	Su: ACN (40:60)	0,8 mL/dk	25 °C	20 µL	Mobil faz	~ 4 dk	(Kumar, Annapurna ve Pavani, 2013)
C18, 5 µm, 125 x 4.60 mm (100Å)	210 nm	Su: ACN (40:60)	1,0 mL/dk	25 °C	20 µL	ACN	~ 4 dk	(Patel, Patwari ve Suhagia, 2014)
ODS C18, 5 µm, 250 x 4.60 mm	210 nm	ACN: Tampon (KH ₂ PO ₄) (30:70) (ortofosforik asit ile pH 4,5'e ayarlanır)	1,0 mL/dk	25 °C	20 µL	Mobil faz	~ 3 dk	(Harisudha ve diğerleri, 2013)
C18, 3,5 µm, 150 x 4.60 mm	230 nm	MeOH : Su (35:65) + 1 mL/L TFA	0,5 mL/dk	40 °C	10 µL	MeOH:Su (80:20)	-	(Hutchinson, Liou, Best ve Zhao, 2010)

KH₂PO₄: Potasyum dihidrojen fosfat: ACN: Asetonitril: MeOH: Metanol: THF: Tetrahidrofur: TFA: Trifloroasetik asit: RT: Rufinamit alkonma zamanı

2.6.2. Farmakokinetik özellikler

Oral alımın ardından rufinamit yüksek oranda emilir (% 85) (Coppola ve diğerleri, 2014) (Wheless ve Vazquez, 2010) (Bialer ve diğerleri, 1999) (la Marca ve diğerleri, 2013) fakat emilim oldukça yavaştır ($t_{max} > 3sa$) (Xu ve diğerleri, 2016). Yiyecek etkisi rufinamit biyoyararlanımını artırır (Coppola ve diğerleri, 2014) (Wheless ve Vazquez, 2010) (la Marca ve diğerleri, 2013) (Cardot, Lecaillon, Czendlik ve Godbillon, 1998). Yiyecek etkisiyle biyoyararlanımın artmasının nedeni yiyeceklerle birlikte GI sıvı hacminin artması, safra salgılarının artması ve bu sayede rufinamitin daha fazla çözünmesi olarak yorumlanmıştır (Cardot ve diğerleri, 1998).

Tekli ve çoklu dozlamalarda 200 mg ve 1200 mg arasında rufinamit non-lineer farmakokinetik göstermektedir (Xu ve diğerleri, 2016) (la Marca ve diğerleri, 2013). Bunun sebebinin yüksek dozlarda çözünürlük ve absorpsiyonda saturasyona ulaşılması olduğu düşünülmektedir (Gall, Vancea, Szilagyi, Gall ve Kolcsar, 2015) (Ben-Ari, 2005; Douroumis, Bouropoulos ve Fahr, 2007) (Szabó ve diğerleri, 2017) (Saydam ve Takka, 2019).

Gall ve ark. (Gall ve diğerleri, 2015) yetişkin erkek Wistar sıçanlar üzerinde oral ve intravenöz yoldan üç farklı dozda (1mg/kg, 5 mg/kg, 20 mg/kg) rufinamit uygulandığı bir farmakokinetik çalışma gerçekleştirmiştir. Gerçekleştirilen çalışmada yarılanma ömrünün intravenöz yoldan uygulamada 7 saat, oral yoldan uygulamada 13 saat olduğu tespit edilmiştir. Total plazma klirensi intravenöz yoldan uygulamada 84.01 ± 3.80 mL/sa/kg iken oral yoldan uygulamada 95.52 ± 39.45 mL/sa/kg olarak elde edilmiştir. Oral yoldan uygulanan 1 mg/kg ve 5 mg/kg dozları için elde edilen maksimum kan derişimleri (C_{max}) sırasıyla $0,89 \pm 0,09$ µg/mL ve $3.188 \pm 0,71$ µg/mL olarak bulunmuştur. Maksimum derişimine ulaşılması için geçen süre (T_{max}) 4 saattir (2-8 saat). AUC üzerinden kan-beyin bariyerine geçen ilaç miktarının dozdan ya da uygulama yolundan bağımsız olduğu ifade edilmiştir.

Rufinamitin farmakokinetik özellikleri Çizelge 2.5’da toplu olarak sunulmuştur.

Çizelge 2.5. Rufinamitin farmakokinetik özellikleri

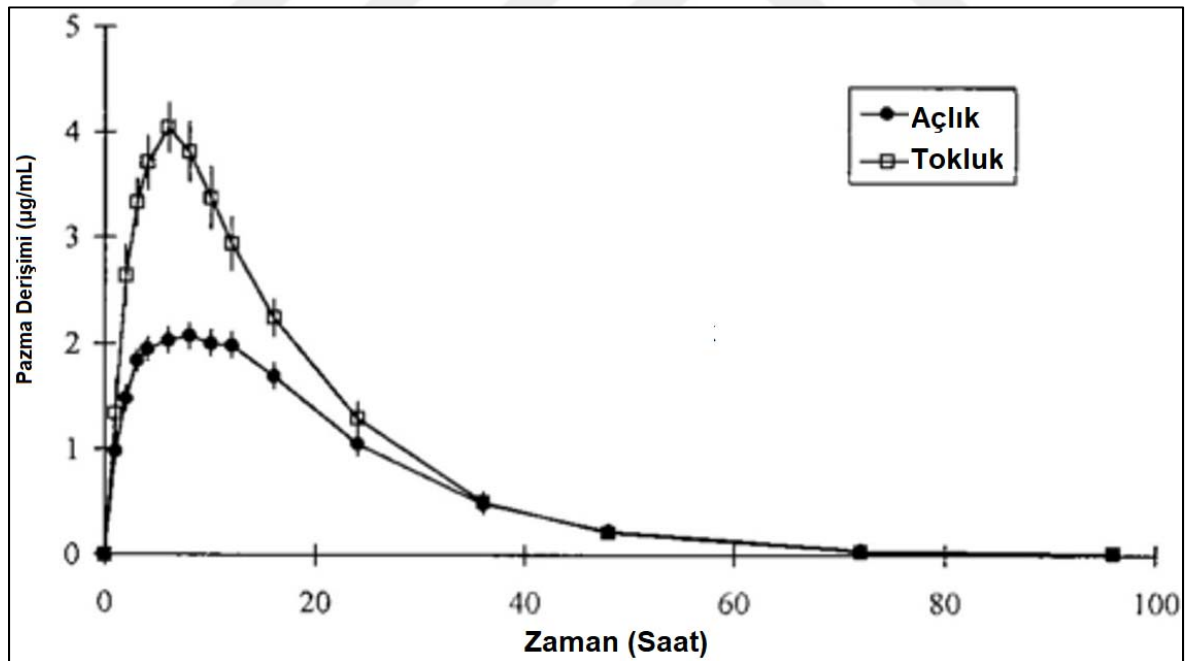
	Özellik	Referans
Oral Biyoyararlanım	% 70 - % 85 (tokluk) (yüksek)	(Coppola ve diğerleri, 2014) (la Marca ve diğerleri, 2013)
	% 48,7 (açlık)	(Szabó ve diğerleri, 2017)
C _{max}	1,81 µg/mL (200 mg, Oral) 2,0-4,0 µg/mL (400 mg, Oral) 3,72 µg/mL (800 mg, Oral)	(Xu ve diğerleri, 2016)
	10mg/kg/gün: 4,01mg/mL 30mg/kg/gün: 8,68mg/mL	(Wier ve diğerleri, 2011)
AUC	34,57 µg.sa/mL (200 mg, Oral) 49-57 µg.sa/mL (400 mg, Oral) 89,02 µg.sa/mL (800 mg, Oral)	(Xu ve diğerleri, 2016)
	10mg/kg/gün: 37,8 ±47 mg.sa/mL 30mg/kg/gün: 89,3 ±58mg sa/mL (AUC _{0-12h})	(Wier ve diğerleri, 2011)
T _{max}	3-8 sa	(Kothare ve diğerleri, 2017) (Coppola ve diğerleri, 2014)
	Açlık: 8 sa : Tokluk: 6 sa	(Cardot ve diğerleri, 1998)
T _{1/2}	6-13 sa	(Kothare ve diğerleri, 2017) (Coppola ve diğerleri, 2014)
T _{Steady-state}	3-8 gün	(Xu ve diğerleri, 2016)
Yiyecek etkisi	C _{max} 'ta %50-% 56 oranında artış AUC'de %34 oranında artış	(Coppola ve diğerleri, 2014)
Cinsiyet etkisi	Yoktur.	(Xu ve diğerleri, 2016)
Varyasyon	Hem tablet hem süspansiyonlarda birey içi varyasyon AUC ve C _{max} için düşüktür (<%26). İlâveten bireyler arası varyasyon da düşüktür (%20).	(Cardot ve diğerleri, 1998)
	Tüm varyasyonlar için süspansiyon ilâç şeklinden elde edilen varyasyon, tablettten daha yüksektir.	(Cheung ve diğerleri, 1995)
Dağılım Hacmi (Vd)	97,2 L (200 mg, Oral), 122,5 L (400 mg, Oral), 174,2 L (800 mg, Oral),	(Xu ve diğerleri, 2016)
	50-80 L	(Coppola ve diğerleri, 2014)
	0,8-1,2L/kg (Çocuk = Yetişkin)	(Wier ve diğerleri, 2011)
Proteinlere bağlanma	% 26 %- % 34 (zayıf)	(Coppola ve diğerleri, 2014) (la Marca ve diğerleri, 2013)
Klirens	5,9 L/h (200 mg, Oral), 7,5 L/h (400 mg, Oral), 9,5 L/h (800 mg, Oral), (düşük)	(Xu ve diğerleri, 2016)
Transport etkisi	P-glikoprotein üzerinde etkisi yoktur	(Asconape, 2018) (Chan, Zhang, Zuo, Kwan ve Baum, 2014)
Metabolizma	Hepatik sirkülasyonda yoğun olarak metabolize olur. Aktif metaboliti yoktur.	(Coppola ve diğerleri, 2014) (Asconape, 2018)
	Primer biyotransformasyon yolağı karboksilesteraz aracılı karboksilamid grubunun asit türevine hidrolizi şeklindedir.	(Coppola ve diğerleri, 2014) (Di ve Obach, 2015) (la Marca ve diğerleri, 2013)
	P450 enzimleri ile (CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4/5, CYP4A9/11-2) etkileşimi yoktur.	(EMA, 2012b)
Atılım	Renal atılım %80 - %90	(Di ve Obach, 2015)
	Dozun <%2'si değişmeden atılır	(Coppola ve diğerleri, 2014)
Farmakokinetik	Non-linear	(eMC, 2020)
BCS	Class II	(Szabó ve diğerleri, 2017)

Yiyecek etkisinin kronik tedavideki etkisi simülasyon yolu ile araştırılmıştır. Tahminler açlık koşulunda denge durumunda (steady state) elde edilen maksimum derişimin, tokluk durumunda minimum derişim ile eşdeğer olduğunu göstermiştir. Dalgalanma sabiti açlık durumunda en düşüktür. En yüksek dalgalanma sabiti, günlük dozlardan birinin açlıkta diğerinin toklukta alındığında elde edilmiştir. Bu şekilde ilaç uygulamasından kaçınılmalıdır. Çalışmaya ait veriler Çizelge 2.6 ve Şekil 2.7’de sunulmuştur (Cardot ve diğerleri, 1998).

Çizelge 2.6. 600 mg dozda (b.i.d) üç farklı uygulama şekli için denge durumu plazma simülasyonu

Tahmin edilen	Simülasyon 1	Simülasyon 2	Simülasyon 3	
	Tüm dozlar açlık	Tüm dozlar tokluk	Birinci doz açlık	İkinci doz tokluk
C_{maxss}	5,24	7,62	5,96	7,15
C_{minss}	4,05	5,24	4,05	5,00
FI	0,25	0,35	-	0,54

FI, dalgalanma sabiti (fluctuation index): C_{maxss} denge durumunda maksimum derişim ($\mu\text{g/mL}$): C_{minss} denge durumunda minimum derişim ($\mu\text{g/mL}$)



Şekil 2.7. Rufinamitin sağlıklı gönüllülerde 600 mg oral uygulaması sonucu açlık (fasted) ve tokluk (fed) koşullarında elde edilen plazma derişimleri ($\pm\text{S.E.M.}$)

İlaç etkileşimleri

Rufinamit diğer antiepileptiklerin plazma derişimlerini etkilemez fakat fenitoin, fenobarbital, valproat ve primidon rufinamitin klirensini etkiler (Di ve Obach, 2015).Yapılan in-vivo etkileşim çalışmalarına göre CYP 3A4 substratı olan triazolam ve oral kontraseptiflerin, CYP 3A4 indüksiyonu yolu ile maruziyetini düşürebilir. Rufinamit karboksilesteraz ile metabolize olmaktadır. Karboksilesteraz aktivitesini indükleyen etkin maddeler (örn. karbamazepin ve fenobarbital), rufinamit klirensini artırabilir. Karboksilesteraz inhibitörü etkin maddeler, rufinamit metabolizmasını yavaşlatabilir (FDA, 2020a).

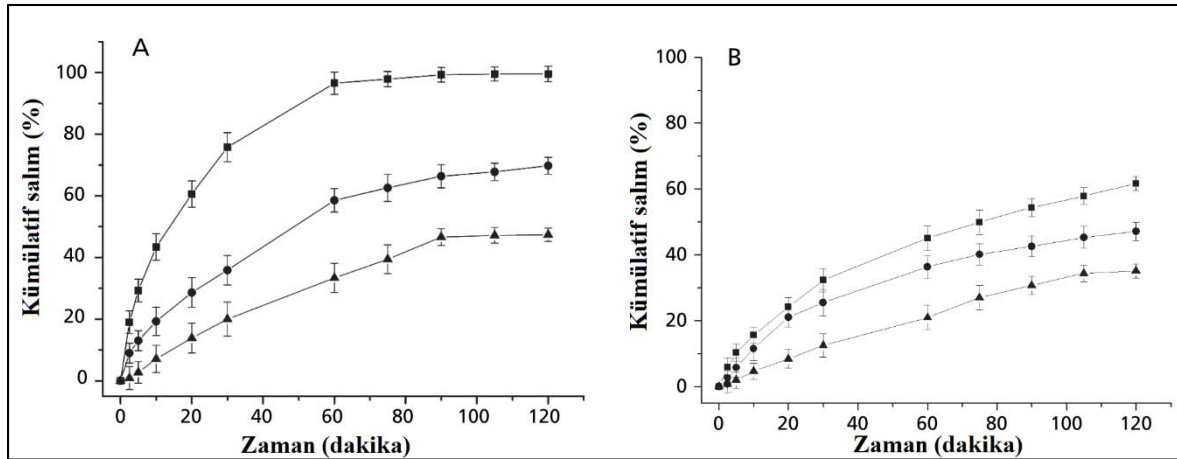
2.6.3. Formülasyon tipleri

Rufinamit Avrupa’da Inovelon[®], Amerika’da Banzel[®] ismi ile 100 mg, 200 mg ve 400 mg’lık film tabletleri ve 40 mg/mL oral süspansiyonları halinde bulunur. Film tabletlerin çekirdek içeriğinde laktoz monohidrat, mikrokristalin selüloz, mısır nişastası, kroskarmeloz sodyum, hidroksipropil metilselüloz, magnezyum stearat, sodyum lauril sülfat ve kolloidal silikon dioksit bulunur. Film kaplama materyalinin içeriğinde ise hidroksipropil metilselüloz, makrogoller (8000), titanyum dioksit, talk, kırmızı demir oksit bulunur (eMC, 2020). Her bir 100 mg film kaplı tablet 20 mg laktoz monohidrat içermektedir (EMA, 2012b).

Novartis firmasının referans ürünle ilgili patentinde üretim yöntemi tarif edilmiştir. Bu patente göre etkin madde öncelikle su ile granül edilmektedir. Ardından elekten geçirilmiş laktoz monohidrat, mısır nişastası, mikrokristalin selüloz, hidroksipropil metilselüloz (HP-M-603) ve sodyum lauril sülfat eklenerek tekrar su ile granülasyon yapılmaktadır. Islak kütle kurutulmakta, elekten geçirilmekte, ardından üzerine geri kalan yardımcı maddeler eklenerek homojen karışması sağlanmaktadır. Elde edilen granül, tabletler halinde basılmaktadır. Son olarak basılan tabletler, film kaplama çözeltisi ile kaplanmaktadır (Portman ve diğerleri, 2011).

Douroumis ve ark. (Douroumis ve diğerleri, 2007), çözücü uçurma tekniği ile hazırlanmış karbamazepin, okskarbazepin ve rufinamit katı dispersiyonlarının çözünme üzerindeki davranışını incelemişlerdir. Bu amaçla kloroform-metanol karışımı içerisinde ilaç: HPMC

(1:4) maddeleri çözündürülerek katı dispersiyonları hazırlanmıştır. Çözücü 40°C’de rotary evaporatör yardımı ile uçurulmuştur. Rufinamit çözünme davranışı bir miktar hızlanmıştır (Şekil 2.8). Çözünme davranışındaki değişimin nedeninin, polimerdeki hidroksil grubu ile etkin maddelerdeki amid grubu arasındaki etkileşmeye bağlı olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.



Şekil 2.8. Karbamazepin (■), Okskarbazepin (●) ve Rufinamit (▲) HPMC katı dispersiyonlarının (1:4) saf sudaki çözünme profilleri (A) Katı dispersiyon: (B) Saf etkin madde (Ort. $\pm$ SS (n = 3))

Chatakonda ve ark. (Chatakonda ve diğerleri, 2012) rufinamitin pek çok çeşitli dolgu maddesi ile (laktoz, mannitol, üre) çözücü uçurma tekniğini kullanarak katı dispersiyonlarını hazırlamış ve çözünme üzerindeki etkisini incelemiştir. Çözücü olarak metanol seçilmiştir. Rufinamit ve dolgu maddesi çözücü içinde disperse edilip kurutulmuştur. Elde edilen sonuçlar, mannitol ile hazırlanan katı dispersiyonda çözünmenin hızlandığını göstermiştir. 8 saat sonunda elde edilen çözünen madde miktarı saf etkin madde için %79 iken mannitol ile hazırlanan katı dispersiyonda bu değer %100’e ulaşmıştır.

US 20150182458 A1 (Reddy, Reddy, Reddy, Reddy ve Krishna, 2015) patentinde rufinamitin yine çözücü uçurma tekniği ile hazırlanmış katı dispersiyonu tarif edilmiştir. Bu amaçla araştırmacıların kullandığı taşıyıcılar kopovidon, Span 20, etil selüloz, hidroksipropil metilselüloz, polietilen glikol ve Soluplus®’tır. Tercih edilen çözücüler ise dimetilsülfoksit, dimetilasetamit, dimetilformamit, metanol, etanol, isopropanol, n-butanol ve n-pentanol olmuştur. Çözücü distilasyon, liyofilizasyon ya da spray-drying yöntemleri ile kurutulmuştur. İlaç: taşıyıcı oranları 1:8 ile 1:20 arasında değişmiştir. Geliştirilen yöntemin tekrarlanabilir ve endüstriye uygun bir yöntem olduğu ifade edilmiştir.

Bununla birlikte literatürde rufinamitin sıcak eriyik ekstrüzyonu (hot-melt extrusion, HME) ile hazırlanmış bir katı dispersiyonuna ait bir çalışma henüz bulunmamaktadır.

2.6.4. Farmakoeкономи

Türkiye’de tedarik edilebilen referans ürün İnovelon Süspansiyon (40mg/mL, 460 mL şişe/kutu) ve Inovelon Film Tablet (200 mg/50 tablet/kutu ve 400 mg/60 tablet/kutu) (Eisai Ltd. İngiltere) olup 2014 yılından itibaren yurtdışı ilaç listesindedir ve TEB aracılığıyla getirilmektedir (TITCK, 2020). Dünya’da ilaveten 100 mg tablet şekli de bulunmaktadır.

1993 yılında İngiltere’de epilepsi için yapılan toplam harcamanın yılda £1930 milyon olduğu tahmin edilmektedir. Maliyet-fayda analizleri, rufinamitin tedavide kullanımının, bu maliyeti diğer anti epileptik ilaçlara kıyasla 5 kat artırabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla, farmakoeekonomik veriler rufinamitin daha etkili fakat aynı zamanda daha pahalı olduğunu ortaya koymuştur. Buna rağmen LGS gibi yıkıcı bir nadir hastalık için değerli bir tedavi seçeneği olarak düşünülmektedir (McCormack, 2012).

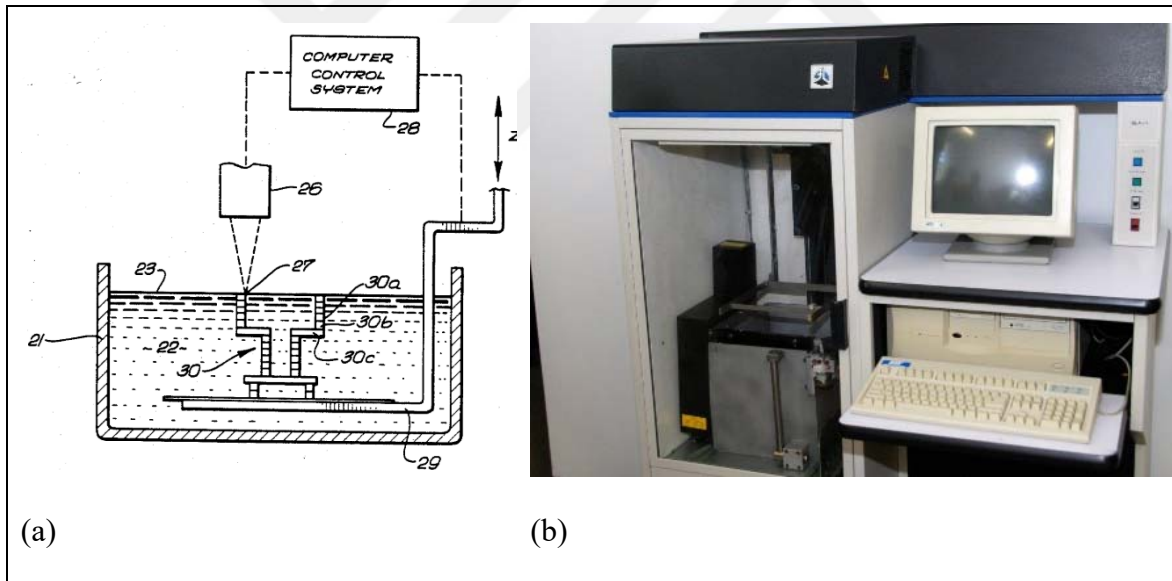
Rufinamitin model ilaç seçilme nedeni, yüksek erime derecesine sahip olmasıdır ($\geq 230^{\circ}\text{C}$). Bu sayede hot-melt ekstrüzyon ile oluşturulan katı dispersiyonlarında “amorf katı süspansiyon” elde edilebilmektedir. Bu katı dispersiyon tipinde etkin madde erimemekte ve kristal yapısını korumakta, bununla birlikte rekristalizasyon gibi stabilite problemleri yaşamaksızın in-vivo biyoyararlanım ciddi şekilde artabilmektedir (Yan ve diğerleri, 2012) (Ali, Williams ve Rawlinson, 2010).

2.7. Eklemeli Üretim

2.7.1. Genel bilgilendirme

Oral ilaç şekilleri; invazif olmaması, sıvı ilaç şekillerine göre daha yüksek stabiliteye sahip olması ve hasta uyuncunun yüksek olması nedenleriyle en fazla tercih edilen ilaç şekilleridir. Bununla birlikte oral ilaç şekillerinin üretiminde geleneksel üretim ekipmanlarının yetersiz olduğu durumlar vardır. Düşük raf ömürlü etkin maddeler için talep üzerine üretim mümkün değildir. Geleneksel üretimde sabit dozlu bitmiş ürünler elde edildiği için dozlama rejimi genellikle esnek değildir. Bu da kişiselleştirilmiş tedavi için yetersiz kalmasına sebep olmaktadır. Bununla birlikte yetim ilaçlar gibi düşük ölçek boyutlu ürünlerin üretimi,

geleneksel ekipmanların ölçek boyutları için uygun olmamaktadır. Eklemeli üretim tekniğinin tüm bu problemlerin önüne geçebilecek bir teknik olması, farmasötik gelişim çalışmalarında eklemeli üretim tekniklerinin dikkat çekmesine neden olmuştur. Eklemeli üretim; medikal, otomotiv, havacılık ve uzay teknolojileri gibi pek çok endüstride hizmet veren oldukça yeni bir üretim yöntemidir. İlk defa 1986 yılında fizik mühendisi Charles (Arzimanoglou ve diğerleri) W. Hull tarafından geliştirilmiş ve patentlenmiştir (Şekil 2.9) (Hull, 1986). Buluşunun ardından endüstriyel boyutta 3D yazıcı üreten *3D Systems* isimli firmasını kuran Hull adına tescilli 100’den fazla patent bulunmaktadır (Guardian, 2014; Wikipedia, 2020). 2014 yılında Avrupa patent ofisi tarafından “European Inventor Award” ödülünü almıştır (EPO, 2014). Charles Hull günümüzde “3DP’nin babası” olarak anılmaktadır (Guardian, 2014). Yapılan bir röportajda Hull’a 3DP’nin günümüzde geldiği noktada en şaşırtıcı bulduğu kullanım alanı sorulduğunda, medikal uygulamaların kendisini çok şaşırttığını ifade etmiştir (CNN, 2014).

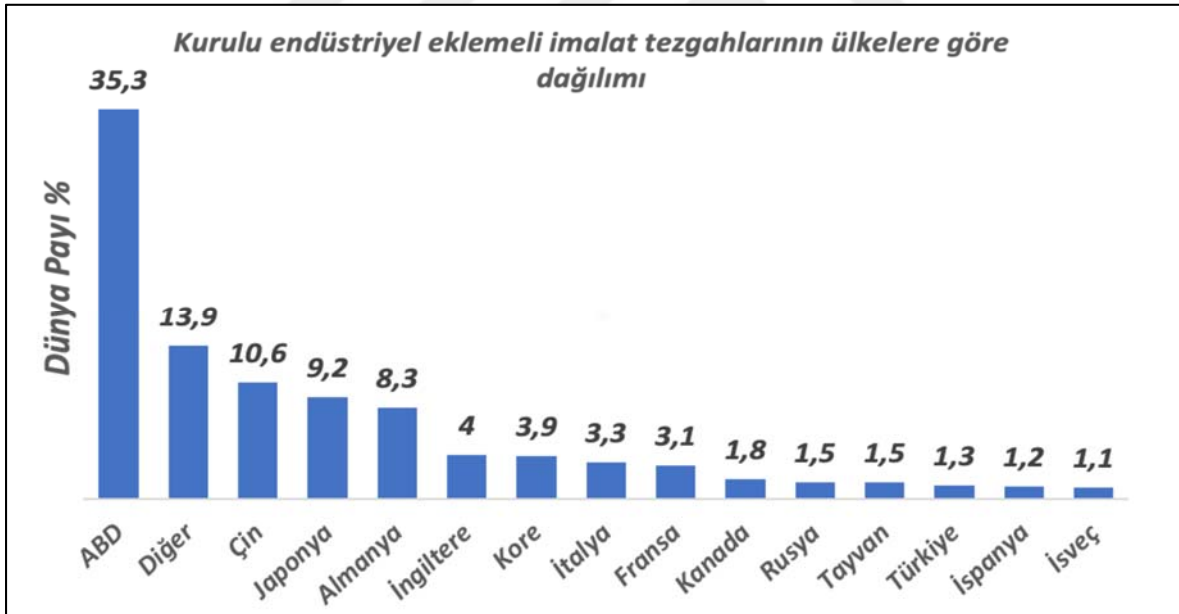


Şekil 2.9. Charles W. Hull tarafından ilk defa geliştirilen ve patentlenen 3D yazıcıya ait (a) patent isteminde tarif edilen cihaz çizimi (Hull, 1986), (b) cihaz görünümü (3dprint, 2015)

2020 yılında T.C. Cumhurbaşkanlığı Savunma Sanayi Başkanlığı, eklemeli imalat teknolojileri yol haritası raporuna göre Türkiye’de 3 boyutlu yazıcı kullanımı dünyadaki eğilim ile beraber paralel bir seyir izlemektedir. 2017 yılı için oluşturulan Türkiye’deki mevcut 3 boyutlu yazıcı durumu Şekil 2.10’da, dünyadaki durumu ise Şekil 2.11’de sunulmuştur (T.C.Cumhurbaşkanlığı, 2020).

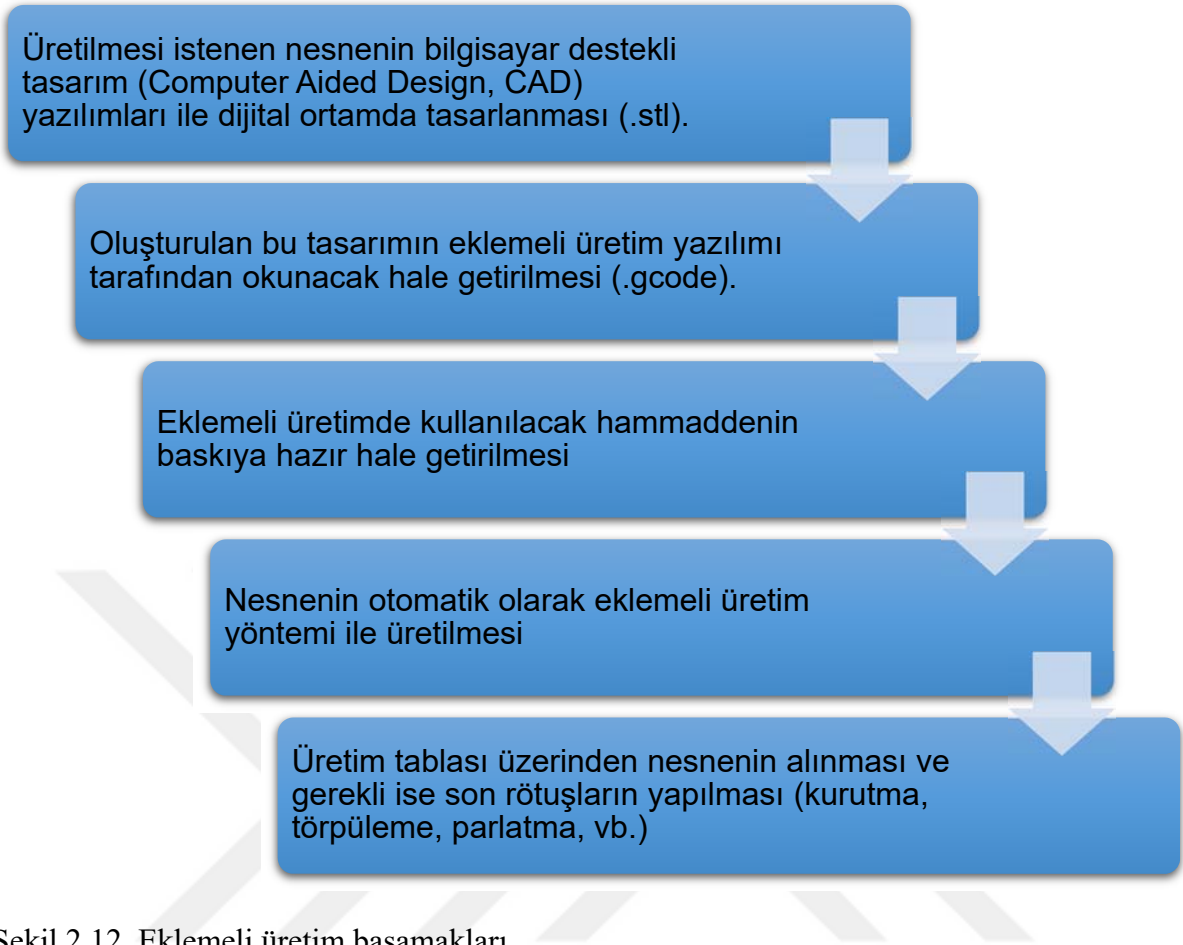


Şekil 2.10. Türkiye’de mevcut 3 boyutlu yazıcı durumu



Şekil 2.11. Endüstriyel eklemeli imalat tezgâhlarının ülkelere göre dağılımı

Eklemeli üretim çok farklı üretim teknikleriyle gerçekleştirilebilmektedir. Bununla birlikte genel üretim basamakları Şekil 2.12’deki gibi olmaktadır (Norman, Madurawe, Moore, Khan ve Khairuzzaman, 2017).



Şekil 2.12. Eklemeli üretim basamakları

Farmasötik üretimde eklemeli üretim, bitmiş ürünün dijital olarak tasarlandığı ve tabakalar halinde basıldığı yeni bir üretim yöntemidir. Son yıllarda araştırmacılar farmasötik alanda eklemeli üretimde kullanımı üzerinde pek çok çalışma ve yayın yapmaktadırlar (Jaboore ve Oyewumi, 2015). Uzun yıllardır kullanılan geleneksel tablet baskı tekniklerine göre, özellikle kompleks ve dar terapötik indeksi olan ürünlerde, proses kapasitesi ve üretim esnekliği yönlerinden oldukça büyük üstünlükler sağlamaktadır. Özellikle kişiye özgü tedavide büyük üstünlük taşımaktadır. Bu sayede ilaç ürününe ait etkinlik, kalite ve güvenlik gerekliliklerinin iyileştirilmesi ile birlikte ilaca ulaşılabilirlik de artacaktır (Norman ve diğerleri, 2017) (Gültekin, 2021).

Ağustos 2015'te Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration, FDA) tarafından ilk eklemeli üretim ürününün onaylanması ile (Spritam® Tablet) farmasötik üretim teknikleri için çok yeni bir sayfa açılmıştır (Aprecia, 2020). Spritam® tablet, 1000 mg Levetirasetam içeren ve patentli “Zipdose” eklemeli üretim tekniği ile üretilen, çok özel por yapısı sayesinde geleneksel baskı yöntemleri ile elde edilemeyecek kadar hızlı, saniyeler

içinde ağızda dağılan bir tablettir (Jacob ve diğerleri, 2016b). Hızlı dağılması özellikle yutmada güçlük çeken hastalar için büyük bir üstünlüktür. Spritam® tablet, toz yatağı üzerine bağlayıcı bir sıvının püskürtülmesi tekniği (inkjet deposition) ile üretilmektedir (Jacob ve diğerleri, 2016a). Yöntemde 30 ila 40 katman toz üzerine sıvı püskürtülerek hedef etkin madde içeriği ve tablet ağırlığına ulaşılmaktadır. Kullanılan cihazın bir oda büyüklüğünde olduğu ve günde on binlerce tablet üretilbildiği belirtilmiştir (Notman, 2018). Yöntem ve cihaza ait görsel Şekil 2.13'te sunulmuştur.



Şekil 2.13. Zipdose® teknolojisi görsel (a) Teknolojinin şematik gösterimi: (b) Aprecia firmasında kullanılan yazıcı

Eklemeli üretimle ilgili bir diğer ilgi çekici gelişme, 2017 yılında 3DP ilaç üreten Aprecia (Cincinnati) firması ile yetim ilaç üreten Cycle Pharmaceuticals (Cambridge) arasında yapılan işbirliği anlaşmasıdır. Cycle Pharmaceuticals CEO'su bu iş birliğiyle ilgili, 3DP teknolojisinin kişiye özel üretim yapılabilirdiği ve yüksek etkin madde yüklemesi ile hızlı salım sağlayabilen bir teknik olduğu için özellikle tedavisi çok zor olan yetim hastalıklara sahip kişilerde yaşam kalitesini artırıcı bir yöntem olacağı şeklinde açıklama yapmıştır (Pharmaceutical Technology, 2017). Bu sayede yetim ilaçlar endüstriyel boyutta 3DP tekniği ile üretilbilecektir.

Eklemeli üretim sistemleri ile ilgili ISO/ASTM tarafından yayımlanmış pek çok standart mevcut olup başlıcaları aşağıdaki gibidir (STM, 2016).

- ISO/ASTM 52900-15 Standard Terminology for Additive Manufacturing-General Principles-Terminology
- ISO/ASTM NP 52902 Additive manufacturing-General principles-Standard test artifacts

- ISO/ASTM DIS 52903-1 Additive Manufacturing-Standard Specification for Material Extrusion Based Additive Manufacturing of Plastic Materials- Part 1: Feedstock materials
- ISO/ASTM AWI 52903-2 Additive manufacturing-Standard specification for material extrusion based additive manufacturing of plastic materials-Part 2: Process – Equipment
- ISO/ASTM DIS 52910 Standard Practice-Guide for Design for Additive Manufacturing
- ASTM F3091/F3091M-14 Standard Specification for Powder Bed Fusion of Plastic Materials
- ISO 17296-3:2014 Additive manufacturing-General principles-Part 3: Main characteristics and corresponding test methods
- ISO 17296-4:2014 Additive manufacturing-General principles- Part 4: Overview of data processing

Bununla birlikte, eklemeli üretim yöntemi dünya ilaç regülasyonu için de yeni bir yaklaşımdır. 2017 yılında FDA teknik gereklilikleri kapsayan taslak kılavuzlar yayımlamış olup (FDA, 2017) özellikle hastane ve eczanelerde majistral olarak üretilen ürünler için büyük üstünlük sağlayacağı düşünülmektedir (Allen, 2016). Yazıcı materyallerinin ilaç üretimine uygun olmaması ve yazıcıda meydana gelebilecek bir hatanın ürüne yansması, bitmiş ürün güvenliği açısından ilaçla ilgili düzenleyiciler tarafından önemli olduğu belirtilmiştir (Gosnear, 2016).

Ekstrüder içeren eklemeli üretim yöntemlerinde vidaların ve tüm sistemin temizliği çok zordur, çapraz kontaminasyonun engellenmesi amacıyla uygun bir temizlik yönteminin geliştirilmesi ve valide edilmesi gerekmektedir (Melocchi ve diğerleri, 2016). Üretim yönteminin “seri üretim” şeklinde değil, “sürekli üretim (continuous manufacturing)” şeklinde değerlendirilmesi gerektiği regülasyon tarafından düşünülmektedir (Hussain, Watts ve Buhse, 2005). İlave olarak özellikle grip aşısı üretimi gibi validasyona zaman olmayan ve hızlı üretilmesi gereken ürünler için üretim yöntemlerinin proses validasyonunun, “bir ürün değil 3D- platformun validasyonu” şeklinde olup olamayacağı tartışılmaktadır (Hussain ve diğerleri, 2005).

Eklemeli üretimde, üretim bir yazılım yardımıyla tasarlanmakta ve bu tasarıma bağlı olarak gerçekleştirilmektedir. Bu üretim cihazlarının temini ve kullanımı geleneksel üretim sistemlerine göre çok daha kolay ve az maliyetli olduğu için eklemeli üretim yapılan ilaçlarda sahtecilik daha kolay yapılabilecektir. Dolayısıyla bilgisayarlı sistem üzerine

olabilecek herhangi bir siber saldırı, bitmiş ürün tasarımını çalabileceğinden ya da tamamen değiştirebileceğinden, bu sistemlerin siber saldırılara karşı çok iyi korunması gerekmektedir. İlaç üreticilerinin eklemeli üretim yöntemlerini patentlemeleri de büyük önem taşımaktadır (Gosnear, 2016). Bununla birlikte henüz piyasada yaygınlaşmamış yeni bir yöntem olması nedeniyle patent konusunda yeterli tecrübe henüz elde edilmemiştir (Ventola, 2014). Yer çekimsiz ortamda üretim ve uzay ortamında üretim dünya genelinde havacılık ve uzay faaliyetleri yürüten kurumlar tarafından çalışılmakta olan bir konudur. MadeInSpace adlı bir firmanın uzay ortamında kullanım için ürettiği ticari uzay 3 boyutlu yazıcı, NASA tarafından Uluslararası Uzay İstasyonu'nda 2016 yılından bu yana kullanılmaktadır ve 200'den fazla parça imal edilmiştir (T.C.Cumhurbaşkanlığı, 2020). Mart 2017'de "Baylor College of Medicine", NASA tarafından talep edilen ve uzun uzay yolculukları ve Mars görevinde astronotların kullanması amacıyla eklemeli üretim yöntemi ile üretilen ilaç gelişimi için destek programı açmıştır. Uzun süreli uzay yolculuklarında astronotların ihtiyaç olduğu zaman ve ihtiyacı kadar ilacı üretebilmesi amaçlanmıştır (TRI, 2017).

2.7.2. Eklemeli üretimin üstünlükleri

Katı ilaç şekilleri için eklemeli üretim yönteminin geleneksel üretim yöntemlerine göre üstünlükleri Çizelge 2.7'de sunulmuştur (Norman ve diğerleri, 2017) (Alhnan ve diğerleri, 2016).

Çizelge 2.7. Katı ilaç şekilleri için eklemeli üretim yönteminin geleneksel üretim yöntemlerine göre üstünlükleri

Konvansiyonel Üretim	3DP Üretimi
➤ Büyük şarjlarda üretilir.	✓ Farmasötik endüstride geleceğin iş modeli olan "Hacimden Değere" (Volume to Value) yaklaşımı doğrultusunda, yetim ilaçlar gibi küçük şarjlı ama değerli ürünlerin üretimi mümkündür (Fiminska, 2014)
➤ Üretimde pek çok ekipman, alan ve operatör gereklidir.	✓ Daha az sayıda ekipman, alan ve operatör ile üretim yapılması mümkündür.
➤ Belirli süre raf ömrü olan ve yüksek sayıda üretimin "seri üretimi" söz konusudur.	✓ Düşük stabiliteli etkin maddeler için istek üzerine istenen sayıda ürünün üretimi mümkündür.
➤ Tabletlerin kırılması esnasında doz modifikasyonunda zorluklar yaşanabilmektedir.	✓ İstenen dozda üretim yapmak mümkündür. Bu sayede çocuklarda uygun dozlama yapılabilmektedir (kişiselleştirilmiş tedavi).
➤ Belirli kalıplarla ve şekillerde üretim yapılmaktadır.	✓ Kompleks ürünlerin üretimi mümkündür (örn. kişisel anatomiye uygun implantlar, çocuklar için değişik geometriler, sıfır derece kinetikle salım, geçimsiz maddelerin kombinasyonu [<i>polypill</i>]).

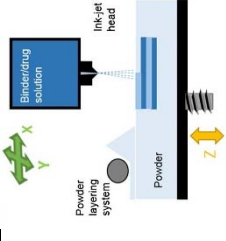
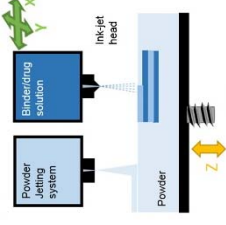
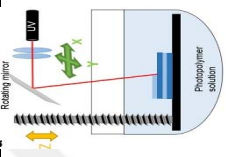
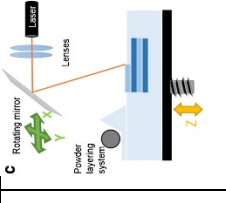
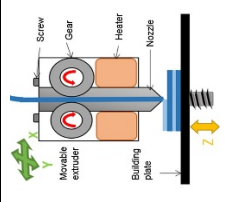
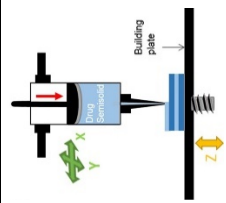
Bununla birlikte eklemeli üretim yöntemine ait bazı sınırlayıcı özellikler aşağıdaki gibidir (Alhnan ve diğerleri, 2016) (Norman ve diğerleri, 2017):

- Farmasötik hammaddelerin düşük mekanik dayanıklılığı,
- Bitmiş üründe düşük mekanik dayanıklılık, yüksek friabilite,
- Düşük üretim hızı,
- Ekstrüzyon başlığında meydana gelebilen tıkanmalar sonucu homojen olmayan akış ve baskı,
- Düşük rezolüsyon sonucu uygun olmayan bitmiş ürün morfolojisi.

2.7.3. Eklemeli üretim çeşitleri

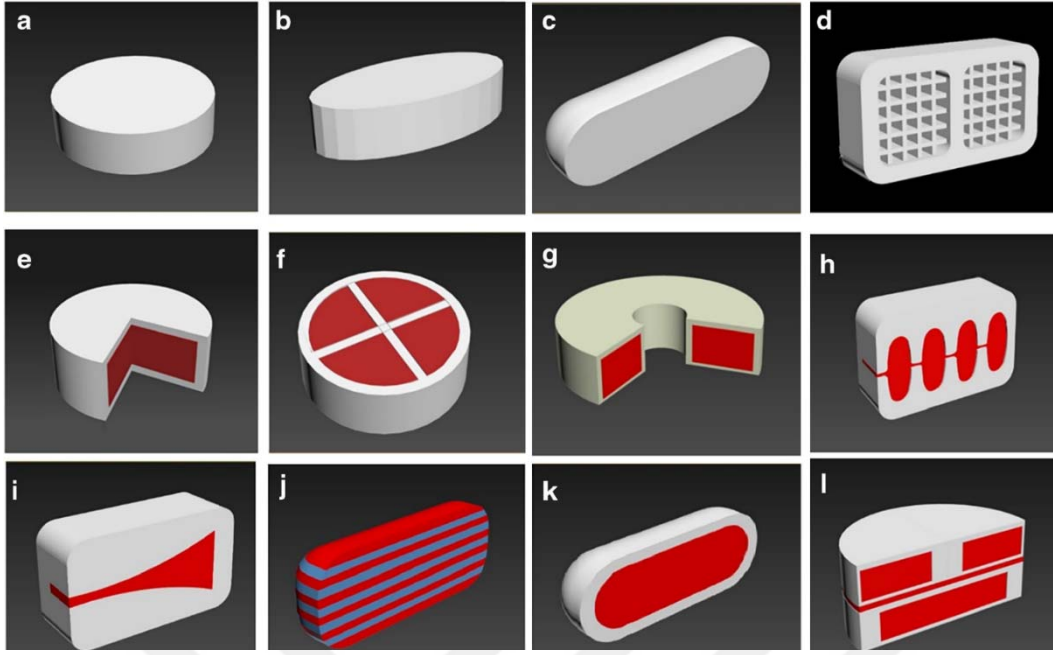
Farmasötik endüstride çok farklı teknolojilerde üretim yapan eklemeli üretim yöntemi, akademik ve endüstriyel amaçlarla kullanılmaktadır. Çeşitli eklemeli üretim teknolojilerine ait özet bilgiler ilerleyen bölümlerde sunulmuştur. Geliştirilmiş tüm yöntemlerin birbirlerine göre farklı özellikleri bulunmakta olup Çizelge 2.8’de (Norman ve diğerleri, 2017) (Alhnan ve diğerleri, 2016) özetlenmiştir. Yöntemlerin birbirlerine göre üstünlükleri ve sakıncaları Çizelge 2.9’da sunulmuştur (Alhnan ve diğerleri, 2016). İlaveten Şekil 2.14’te eklemeli üretim yöntemi ile üretilebilecek farklı geometrilere sahip katı ilaç şekilleri paylaşılmıştır (Alhnan ve diğerleri, 2016).

Çizelge 2.8. Ekllemeli üretim yöntemlerine ait özellikler

Üretim Yüzeyi	Tabakalanma Mekanizması	Inkjet Üretim	Madde Jeti	Foto Polimerizasyon (Stereolitografi) (SLA)	Elektromanyetik Radyasyon	Ekstrüzyon	Ekstrüzyon Temelli Diğer Üretim Yön. (EXT)
Toz yatağı	Toz üzerine püskürtme	+			+		
Serbest yüzey	Basılan materyalin sürekli üretimi		+			+	+
Reçine	Ürün ve ışık kaynağı arasında reçine ilave edilmesi			+			
Bağlayıcı çözeltisi	Yaş granülasyon	+					
Erimiş polimer/ mum	Dondurma		+			+	+
Reçine	Fotopolimerizasyon		+	+			+
İlaç çöz.	Çözücü uçurma						+
İlaç süsp.	Çözücü uçurma						+
Yarıkatı	Çözücü uçurma/ Polimerizasyon						+
İnce toz	Katılaştırma/Düşük erime dereceli bağlayıcının dondurulması				+		
Minimum tabaka kalınlığı		200 µm	-	100 µm	100 µm	100 µm	800 µm
Üretim Şeması							

Çizelge 2.9. Eklemeli üretim yöntemi çeşitlerinin üstünlükleri ve sakıncaları

Teknoloji	Üstünlükler	Sakıncalar
Bağlayıcı ekleme	• Çok çeşitli yardımcı maddeler kullanılabilir. • Oda sıcaklığında üretim yapılır. • Konvansiyonel tablete göre çok daha fazla poröz yapıda, hızlı salan sistemler üretilebilir.	• Baskı sonrası kurutma gerekir. • Tabletlerin friabilitesi yüksek, sertliği düşüktür. • Özel üretim alanı gereklidir. • Üretim yüksek firelidir.
Fotopolimerizasyon	• Sub-mikron boyutundaki nesneler ve tabakalar basılabilir. • Yüksek doğruluk ve hassaslık sağlanır.	• Baskı sonrası işlem gerekir. • Oligomer ve bazı reçineler kaynaklı karsinojenik risk vardır. • Ekipmanlar pahalıdır. • Baskı başlangıç süresi uzundur.
Toz yatağı füzyonu	• İç mikroyapısı ve porozitesi tasarım ile kontrol edilebilir. • Tekrarlanabilir üretim yapılabilir. • Tek bir cisim birden farklı bölgesinde birden farklı porozite yapısında üretilebilir.	• Baskı sonrası işlem gereklidir. • Düşük hızlı bir yöntemdir. • Proses için gereken yüksek enerji bazı etkin madde ve yardımcı maddelerin degradasyonuna sebep olabilir.
Ekstrüzyon ile filament üretimi	• Düşük maliyetlidir ve yaygın kullanım alanı vardır. • Baskı sonrası işlem gerektirmez. • Mekanik olarak dayanıklıdır. Friabilite düşüktür. • Etkin madde homojenitesi yüksektir.	• Proses için gereken yüksek sıcaklık bazı etkin madde ve yardımcı maddelerin degradasyonuna sebep olabilir. • Ön işlem olarak filament üretilmesi gerekir. • Polimerlerin termoplastik özelliklerinden çok fazla etkilenir.
Ekstrüzyon ile diğer üretim yöntemleri	• Proses oda sıcaklığında gerçekleştirilebilir. • Tek bir tablette farklı salım özellikleri elde edilebilir. • %90'a kadar etkin madde yüklenmesi mümkündür.	• Baskı sonrası işlem gereklidir. • Tabletlerin friabilitesi yüksek, sertliği düşüktür. • Rezolüsyon düşüktür. • Ekstruder ucundan yarı katı maddenin akış hızının kontrolü zordur



Şekil 2.14. Eklemeli üretim yöntemi ile üretilebilecek farklı geometrilere katı ilaç şekilleri (a) basit disk, (b) oval, (c) kolay yutulabilir kaplet, (d) kısmen delikli tablet, (e,f) çekirdek ve kılıfın farklı içerikle tasarlandığı sistemler, (g) sıfır derece kinetikle salım yapan çörek biçimli tablet, (h) pulsatil salım yapan sistem, (i) jel dolgulı hızlandırılmış salım yapan sistem, (j,k) iki etkin maddeyi ayrı ayrı salım yapabilecek sistemler, (l) farklı salım hızlarına sahip birden fazla etkin madde içeren sistemler

Bağlayıcı ekleme (PB, Powder bed)

Bağlayıcı ekleme yönteminde üretim cihazı toz yatağı üzerine ilaç, yardımcı madde ve/veya bağlayıcı çözeltisini ya da nanosüspansiyonunu küçük damlacıklar halinde, belirli hız ve miktarda püskürtür. Bağlanmayan toz partikülleri nesnenin ayakta durmasını sağlayabilecek destek materyalini oluşturur. Çözücü seçimi, toz özellikleri, etkin maddenin polimorfik özellikleri ve kurutma işlemi, yöntemde etkili parametrelerdir (Norman ve diğerleri, 2017). İlk defa 1980 yılında MIT’de (Massachusetts Institute of Technology) geliştirilmiştir (Alhnan ve diğerleri, 2016). Toz yatağının ıslatılıp kurutulması şeklinde tabakalandırma sağlanması nedeniyle yaş granülasyon yöntemine benzemektedir. FDA tarafından onaylı ilk 3DP tablet olan Spritam®, ZipDose® adı ile patentlenmiş olan bu teknik ile üretilmektedir (Jacob ve diğerleri, 2016a) (Alhnan ve diğerleri, 2016). Yöntemde kullanılan başlangıç materyallerinin (örn. toz, bağlayıcı çözelti) farmasötik endüstride sıklıkla kullanılan maddeler olması, yöntemin başlıca üstünlüğüdür. Bununla birlikte elde edilen bitmiş ürünlerin sertlikleri çok düşük, mekanik dayanıklılıkları zayıf ve rezolüsyonun düşük olması yöntemin sakıncalarındandır (Alhnan ve diğerleri, 2016).

Madde jeti (Material jetting)

Bağlayıcı ekleme yönteminden farklı olarak toz yatağına ihtiyaç duyulmamaktadır. Bu yöntemde üretilecek nesne; eritilmiş polimer, mum, UV-ile sertleşebilen reçine, çözelti, süspansiyon ve çok bileşenli sıvıların damla damla ve tabakalar halinde püskürtülmesi ile elde edilir. Bu yöntemde çözeltinin uygun şekilde sıvılaştırılması, damlacık geometrisi ve yüzeyin ıslanabilirliği çok önemlidir. Bağlayıcı ekleme yöntemine göre üstünlüğü, çok daha pürüzsüz yüzeylerde ürün elde edilebilmesidir (Norman ve diğerleri, 2017).

Fotopolimerizasyon (SLA, Stereolitografi)

Sıvı reçinenin UV ya da daha yüksek enerjili dalga boyundaki ışınlar yardımıyla polimerik reaksiyonu indüklemesi sonucu oluşur. Genellikle üretimden sonra bitmiş ürünün mekanik dayanıklılığını artırmak için parlatma, temizleme gibi işlemlere gerek vardır. Kullanılan reçineler genellikle düşük molekül ağırlıklı poliakrilatlar ile camsı ve kırılgan yapıda epoksi makromer ve monomerleri olmaktadır. Yöntemin üstünlüğü hızlı, yüksek doğrulukta ve çözünürlükte (0,2 μm) prototiplerin hazırlanmasına olanak sağlamasıdır. Bu nedenle doku mühendisliği ve implantların üretiminde kullanılmaktadır (Alhnan ve diğerleri, 2016). Bununla birlikte yöntemin sınırlayıcı özelliklerinden biri, kullanılacak polimerin veya hammaddenin fotopolimerize olabilmesi gerekliliğidir. Ayrıca reçinelerin toksikoloji riski de yöntemin sakıncalarındandır. Kullanılan reçinelerin fotosensitiv olması uzun süreli stabilite problemlerine neden olabilmektedir (Norman ve diğerleri, 2017) (Alhnan ve diğerleri, 2016).

Toz yatağı füzyonu (SLS, Selective laser sintering)

Bu yöntemde üretim, toz yatağının ısı ile yüzeysel olarak eritilerek sertleştirilmesi esasına dayanır. Bu ısı genellikle lazer ya da kızılötesi radyasyon ile sağlanmaktadır. Diğer yöntemlere göre daha hızlı, ancak daha kompleks bir yöntemdir (Norman ve diğerleri, 2017). Bağlayıcı ekleme yöntemine benzer. Farkı katılaştırma işleminde lazer radyasyonunun kullanılmasıdır. Metallerin 3D baskısında sıklıkla kullanılır. Toz başlangıç maddeleri poliamitler, polistirenler veya polikarbonatlar olabilmektedir. Bununla birlikte yüksek enerji gerektirmesi ve bu sebeple etkin madde ve yardımcı maddelerde gözlenebilecek

degradasyon olasılığı nedeniyle farmasötik endüstride kullanımı yaygınlaşamamıştır (Alhnan ve diğerleri, 2016).

Ekstrüzyon ile filament üretimi (FDM, Fused deposition modelling) (Eriyik birikimleme)

En çok tercih edilen yöntemdir. Ekstrüzyon işleminde materyal robotik olarak kontrol edilen bir uçtan çıkarılır. Bağlayıcı ekleme yönteminin tersine, toz yatak ihtiyacı yoktur. Üretim, eritilmiş polimerler ile filament üretilmesi şeklindedir. FDM yönteminde diğer ekstrüzyon yöntemlerinden farklı olarak sıvı ya da yarı katı değil, sadece katı polimerik filamentler kullanılmaktadır.

FDM yöntemi ile üretim yönteminde, öncelikle etkin madde ve yardımcı maddeler uygun bir karıştırıcıda homojen olana kadar karıştırılmakta, ardından bir ekstrüder yardımı ile belirli bir sıcaklıkta filamentler şeklinde ekstrüde edilmektedir (Hot melt extrusion, HME). Elde edilen filamentler daha sonra 3D yazıcıya yüklenmekte ve katı ilaç şekilleri halinde 3D yazıcıda basılmaktadır. Yöntem, ilk defa 1980 yıllarında ortaya çıkmış ve 1990 yıllarında markete girmiştir. İlaç araştırma ve geliştirme çalışmalarında en düşük fiyatlı ve en çok kullanılan yöntem, filament üretimi ile ekstrüzyon olmaktadır (Masood, 2007) (Alhnan ve diğerleri, 2016).

Inkjet sistemlerle karşılaştırıldığında, çok daha basit bir mekanizma ile çok daha kompleks materyallerle çalışma imkanı vermesi açısından üstünlüklüdür. İlaveten bu yöntemde kullanılan filament hammaddeleri termoplastik, biyolojik olarak uyumlu ve biyoparçalanabilir özellikte olmakta ve farklı özelliklerde salım yapan katı ilaçların geliştirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Maulvi, Shah, Patel, Soni ve Shah, 2017). Potansiyel sakıncaları ise işlemde ısı gerektirmesi, etkin madde yükleme kapasitesinin düşük olması ve düşük üretim hızıdır (Norman ve diğerleri, 2017) (Alhnan ve diğerleri, 2016).

FDM-3DP yönteminde karşılaşılabilecek başlıca problemler Çizelge 2.10'daki gibidir:

Çizelge 2.10. FDM-3DP yönteminde karşılaşılabilecek başlıca problemler

Problemler	Açıklama
Filament şişmesi (<i>Die swell</i>)	Polimerler viskoelastik özelliklerine bağlı olarak farklı hızlarda erimektedir. Erime esnasında polimerin zincir uzunluğuna bağlı olarak zincirlerin tamamının serbest hale geçmesi için gereken süreye relaksasyon zamanı adı verilmektedir. Eğer proses süresi relaksasyon zamanından daha kısa olursa, polimer ekstrüder ucundan çıktıktan sonra relaksasyona devam etmekte, bu da çapında artışa ya da şekil bozukluklarına neden olmaktadır. Bunun engellenmesi için ekstruder ucunun uzunluğu artırılabilir (Aho, Boetker, Baldursdottir ve Rantanen, 2015).
Filamentlerde düşük mekanik özellik	Kırılgan filamentler 3DP içerisinde kırılarak tıkanmaya neden olabilmektedir. Benzer şekilde aşırı yumuşak filamentler de 3DP içerisinde ekstrüde edilememektedir (Sadıa, Arafat, Ahmed, Forbes ve Alhnan, 2018). - o HPMC filamentleri sağlamdır fakat yüksek eriyik viskozitesi ve pürüzlü yapısı nedeniyle baskısı zordur. - o EC filamentler pürüzsüz yapıdadır fakat çok kırılgandır 3D printer içinde kırılmaktadır. - o HPC filamentler aşırı yumuşak olduğu için 3DP içerisinde ekstrüde edilememektedir. - o Soluplus® ve Eudragit® L100, 140°C’de eridiği için 3DP’de tek başına basılamamaktadır (Zhang, Feng, Patil, Tiwari ve Repka, 2017) - o D-Mannitol çok kırılgan yapıda olduğundan yüksek derişimde kullanımında kırılan filamentler elde edilmektedir (Khaled, Burley, Alexander, Yang ve Roberts, 2015).
Bant oluşumu (<i>Banding</i>)	Üretim sırasında tablada oluşabilecek titreşim nedeniyle cismin kenarında dalgalı görünüm (Khan, 2016) (Khaled ve diğerleri, 2015) (Norman ve diğerleri, 2017).
Eğilme (<i>Leaning</i>)	Üretim sırasında sürüklenme nedeniyle merkez eksenden kayma (Khan, 2016) (Khaled ve diğerleri, 2015) (Norman ve diğerleri, 2017).
Bükülme (<i>Warping</i>)	Termal genleşme ya da daralmadan kaynaklanan kısmi bükülme (Khan, 2016) (Khaled ve diğerleri, 2015) (Norman ve diğerleri, 2017).
Uzama, Sünme (<i>Stringing</i>)	Ekstruderin çalışmadığı esnada filamentin uzamasına bağlı deformasyon (Khan, 2016) (Khaled ve diğerleri, 2015) (Norman ve diğerleri, 2017).
Yıkılma (<i>Collapse</i>)	Aşırı fazla kütle ya da enerji nedeniyle düşük poroziteli tabaka oluşumu (Khan, 2016) (Khaled ve diğerleri, 2015) (Norman ve diğerleri, 2017).
Atıklar (<i>Residuals</i>)	Tamamlanmamış üretim nedeniyle tablada kalabilecek bağlanmamış toz ya da monomer kalıntısı (Khan, 2016) (Khaled ve diğerleri, 2015) (Norman ve diğerleri, 2017).

FDM tekniği ile ilaç üretimi üzerine yapılmış pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaların bazılarına ait derleme bilgiler aşağıdaki gibi olup diğer literatür çalışmalarına ait özet bilgiler Çizelge 2.11’de sunulmuştur.

Beck ve ark. (Beck ve diğerleri, 2017) tabletlere ilaç yüklü polimerik nanokapsülleri yükleyerek nanoteknoloji ve eklemeli üretim yöntemini birleştirmiştir. Bu amaçla öncelikle HME tekniği ile flamenler üretilmiş, ardından bu filamentlerden FDM yöntemi ile disk şeklinde tabletler elde edilmiştir. Elde edilen tabletler ilaç yüklü polimerik nanokapsüllerin bulunduğu sulu süspansiyonda 24 saat bekletilmiş ve ardından 30°C’de 24 saat kurutulmuştur. Tabletlerin iç örgü sıklığı tasarım başında belirlenmiş olup oluşturulan porlara nanokapsüllerin hapsedilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla suda şişen Eudragit RL 100 ve şişmeyen PCL (poly(ϵ -caprolacton) olmak üzere iki farklı polimerle tabletler elde edilmiş, bu tabletlerin etkin madde yükleme kapasiteleri ve in-vitro çözünme profilleri incelenmiştir. Formülasyonlarda ilaveten kanal oluşturma amacıyla mannitol de kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre kanal oluşturuucu madde olan mannitol kullanımının etkin madde yükleme kapasitesini artırdığı gözlenmiştir. İlaveten tabletlerin polimerik nanopartikül içeren sulu süspansiyonunda bekletilme süresinin de etkin madde yükleme kapasitesi üzerinde lineer ve pozitif bir etkisi olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte ilaç salımının kullanılan polimerik materyalin tipine ve kanal oluşturuucu maddeye bağlı olduğu, daha geniş kanallara sahip ve daha yüksek etkin madde yüklenebilmiş tabletlerden salımın daha hızlı olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak yapılan çalışmanın nanopartikül süspansiyonları için farklı bir taşıyıcı sistem olarak kullanılabileceği, bu sayede kişiye özgü yeni formülasyonlar tasarlanabileceği yorumu yapılmıştır.

Varan ve ark. (Varan, Wickstrom, Sandler, Aktas ve Bilensoy, 2017) gerçekleştirdikleri bir çalışmada, özellikle yüksek varyasyon gösteren kanser gibi hastalıkların tedavisinde, kişiye özgü ilaç uygulamalarını vurgulamak amacıyla eklemeli üretim tekniği ile antikanser (paklitaksel) ve antiviral (sidofovir) içeren formülasyon geliştirmişlerdir. Kullanılan metot, lokal uygulamada kullanmak üzere etkin maddenin inkjet ile adezif film üzerine püskürtülmesi şeklindedir. Bitmiş ürün tasarımına göre in-vitro çözünme özelliklerinin modifiye edilebileceği, in-vitro hücre kültürü çalışmalarına göre servikal kanser hücresinde etkili olduğunun gözlenmesi nedeniyle ümit vaadeden bir formülasyon olduğu yorumu yapılmıştır.

Jamroz ve ark. (Jamroz ve diğerleri, 2017) eklemeli üretim tekniği ile aripiprazol içeren ağızda çözünen film formülasyonu geliştirmişlerdir. Bu amaçla FDM ile eklemeli üretim tekniğinden faydalanmışlardır. Çalışmada düşük çözünürlüğe sahip aripiprazolün oral film formülasyonu ile çözünme özelliğinin hızlanacağı hedeflenmiştir. Bu amaçla poröz yapıda PVA ve etkin madde içeren filmler oluşturulmuş ve filmlerden etkin madde salımının, geleneksel film üretim yöntemi ile hazırlanan filmlere göre hızlandığı tespit edilmiştir.

Gioumouxouzis ve ark. (Gioumouxouzis, Katsamenis, Bouropoulos ve Fatouros, 2017) FDM yöntemini kullanarak suda çözünebilen bir polimer olan polivinil alkol (PVA), mannitol ve hidroklorotiyazid (HCTZ) içeren filamentler üreterek tablet baskı işlemi gerçekleştirmiştir. Tabletler, çekirdekte suda çözünen PVA-Mannitol-HCTZ, etrafında ise suda çözünmeyen polilaktik asit (PLA) ile kaplanacak şekilde tasarlanmıştır. Elde edilen tabletler DSC, TGA ve XRD ile karakterize edilmiş, çözünme çalışması esnasında iç yapısındaki değişikliğin takibi amacıyla 4D-CT yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre HCTZ'nin amorf durumda bulunduğu, çözünmenin sıfır derece kinetikle gerçekleştiği gözlenmiştir.

Zhang ve ark. (Zhang ve diğerleri, 2017) model ilaç olarak parasetamol kullanmış ve farklı polimerlerle tablet formülasyonları geliştirmişlerdir. Çalışmada eklemeli üretim yöntemi ile elde edilen tablet, çözünme özellikleri bakımından direkt baskı ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 3DP tabletler ile çok daha iyi bir geciktirilmiş salım sağlandığı bildirilmiştir.

Goyanes ve ark. (Goyanes ve diğerleri, 2017a) parasetamol ve enterik polimerlerle filament oluşturarak FDM tekniği ile tablet baskı gerçekleştirmişlerdir. Yapılan çalışmada farklı enterik polimerlerin salım üzerindeki etkileri incelenmiş olup etkin madde salımının polimer tipi, ilaç yükleme miktarı ve tabletin iç yapısından etkilendiğini gözlemlemişlerdir. Kullanılan polimer tipine göre hem hızlı hem de geciktirilmiş salım sağlayan tabletler elde edilmiş, bu nedenle eklemeli üretim yönteminin istenen özellikte salım sağlayabilecek bir tablet baskı tekniği olduğu yorumu yapılmıştır.

Goyanes ve ark. (Goyanes, Buanz, Basit ve Gaisford, 2014) PVA polimeri kullanarak FDM yöntemi ile tabletler basmışlar, bu esnada tablet içi dolgu tasarımının model ilaç olan floresein salımı üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Çözünme çalışmaları incelendiğinde

beklenildiği üzere iç dolgu ne kadar sıkı olursa salımın da o kadar yavaşlayacağı, bu doğrultuda istenen salım özelliklerinin iç dolgu tasarımı ile elde edilebileceği yorumu yapılmıştır.

Goyanes ve ark. (Goyanes, Robles Martinez, Buanz, Basit ve Gaisford, 2015c) başka bir çalışmalarında tablet geometrisinin salım üzerindeki etkisini incelemek istemişlerdir. Bu amaçla geleneksel yöntemlerle elde edilemeyecek küp, piramit, silindir, küre ve simit şekillerinde tabletleri eklemeli üretim yöntemi ile üretmişlerdir. Model ilaç olarak parasetamol, polimer olarak PVA kullanılmıştır. Çözünme profilleri karşılaştırıldığında çözünmenin yüzey alana bağlı değil, yüzey alan/hacim oranına bağlı olduğunu tespit etmişlerdir. Bu sayede istenen salım özelliklerinin tablet geometrisi tasarımı ile elde edilebileceği yorumu yapılmıştır.

Goyanes ve ark. (Goyanes ve diğerleri, 2015b) farklı bir çalışmalarında budesonid etkin maddesini içeren ve PVA polimeri kullanarak FDM tekniği ile üretilmiş tabletlerde enterik kaplama gerçekleştirmiş, bu sayede eklemeli üretim tekniğinin geleneksel üretim yöntemleriyle (örn. Kaplama) birlikte kullanılabileceğini göstermiştir.

Goyanes ve ark. (Goyanes ve diğerleri, 2017b) eklemeli üretim yönteminin kişisel tedavideki kullanımına dikkat çekmek amacıyla eklemeli üretim yöntemi ile üretilmiş tabletlerin hastalar tarafından kabul edilebilirliği üzerinde bir araştırma yapmışlardır. Bu amaçla en çok tercih edilen yöntem olan FDM tekniğini kullanarak farklı şekil (küre, simit, disk, kapsül ve karo) ve renklerde tabletler üretilmiş ve 50 katılımcıdan ilaçları ele alabilme ve yutabilme özellikleri açısından değerlendirmeleri istenmiştir. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde geleneksel tablet şekli olan kapsül ve disk şeklindeki tabletlerin yüksek oranda tercih edildiği ve simit şeklindeki tabletlerin yutma ve ele alma açısından en fazla tercih edildiği tespit edilmiştir.

Kyobula ve ark. (Kyobula ve diğerleri, 2017) HME-Eklemeli üretim yöntemi kullanarak farklı kompleks iç geometrilere sahip tabletlerin salım özelliklerini incelemişlerdir. Bu amaçla polimer olarak balmumu ve model etkin madde olarak fenofibrat seçilmiş, iç geometrik yapı farklı çaplarda bal peteği şeklinde tasarlanmıştır. Çözünme çalışmaları incelendiğinde bal peteği çapının artışının salım hızını artırdığı, dolayısıyla eklemeli üretim

yöntemi iç tasarımı sayesinde kişiye özgü istenen hızda salım yapabilecek formülasyonların geliştirilebileceği yorumu yapılmıştır.

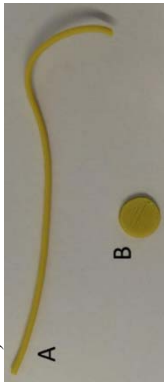
Skowrya ve ark. (Skowrya, Pietrzak ve Alhnan, 2015) PVA filamentler kullanarak FDM-3DP yöntemiyle prednisolon içeren kontrollü salımlı tabletler üretmişlerdir. Bu amaçla PVA filamentler prednisolon etkin maddesini içeren metanol çözeltisinde inkübe edilmiş ve bu sayede %1.9 (a/a) etkin madde yüklemesi gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen termal analizler (Medscape) ve XRPD analizi sonucu prednisolonun tablet içerisinde amorf halde bulunduğu tespit edilmiştir. Bu yöntem ile 24 saat salım yapan 3DP tabletler elde edilebilmiştir.

Ekstrüzyon ile diğer üretim yöntemleri

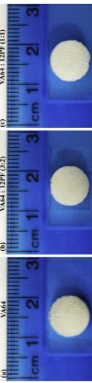
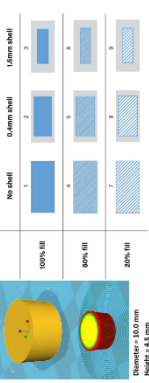
Ekstrüder özellikte kalemler ya da filament oluşturmaksızın baskı yapabilen şırınga benzeri ekstrüder sistemleri ile üretim yapmaya yarayan sistemlerdir (Norman ve diğerleri, 2017) (Alhnan ve diğerleri, 2016). Bu sistemlerle ekstrüde olacak materyalin yarı katı formda, jel ya da pasta halinde olması gerekmektedir. Yöntemin başlıca üstünlüğü yüksek sıcaklık gerektirmemesidir. Sakıncası ise baskı esnasında kurumanın uzun sürmesi nedeniyle yapışma ya da yığılmanın sıklıkla meydana gelmesidir. Bu da cismin yapısında deformasyona neden olabilmektedir. Şırınga tipi sistemlerde ekstrüzyon açıklık çapı 0,4-0,8 mm arasında olduğu için rezolüsyon düşüktür (Alhnan ve diğerleri, 2016). Yukarıda tarif edilen yöntemlerin dışında henüz farmasötik endüstride kullanımı olmayan ancak diğer endüstrilerde uygulamaları bulunan diğer yöntemler:

- Doğrudan enerji depozisyonu,
- Lazer kesme ile laminasyon,
- Elektrospinning
- Voksel üretim işlemleri olarak sayılabilmektedir (Norman ve diğerleri, 2017).

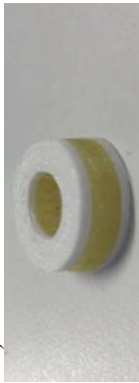
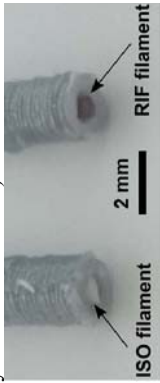
Çizelge 2.11. FDM tekniği ile ilaç üretimi üzerine yapılmış literatür çalışmaları

No	Çalışma Amacı	Etkin Madde	Yardımcı Maddeler	Tasarım Yazılımı	Filament Ekstrüzyonu	3DP Baskı	Referans
1	Hızlı salımlı tablet	Teofilin ve Dipiridamol (etkin madde yükleme oranı: %10) 	PVP, TEC, Talk	Autodesk® Building Design Suite Ultimate 2016	HAAKE Mini CTW Çift vidalı HME. Karıştırma süresi: 5dk Karıştırma sıcaklığı: 100°C Ekst. sıcaklığı: 90°C Tork: 0,4 Nm. Fil. çapı: 1,75 mm	MakerBot Ekst. çap: 0,4mm Ekst. sıcaklığı: 110°C	(Okwosa ve diğerleri, 2016)
2	Hızlı salımlı tablet	Nitrofurantoin (etkin madde yükleme oranı: %5) 	PLA, HPMC	Comsol Multiphysics V. 4.4 ve MakerWare software Ver. 2.4.1	DSMXploremicro compounder Ekst. sıcaklığı: 180°C Ekst. hızı: 30 rpm Fil. çapı: 1,5 mm.	MakerBot Replicator 2X Rezolüsyon: Standard Ekst. sıcaklığı: 190-200 °C	(Boetker ve diğerleri, 2016)
3	Hızlı salımlı tablet	Hidroklorotiyazid (etkin madde yükleme oranı: %12,5) 	Eudragit E, TEC, kroscarmeloz Na, Na nişasta glik., PVP	Autodesk® 3ds Max-Design 2016 software ver. 18.0 & Makerware ver. 2.4.0.17	HAAKE Mini CTW Çift vidalı HME. Karıştırma süresi: 5 dk Karıştırma sıcaklığı: 100°C Ekst. sıcaklığı: 90°C Tork: 0,8 Nm. Fil. çapı: 1,75 mm	MakerBot Replicator 2X Rezolüsyon: Standard Ekst. çap: 0,4 mm Ekst. sıcaklığı: 135 °C Tabla sıcaklığı: 60 °C Infill: %100 Tabaka yitkisi: 200 µm	(Sadia ve diğerleri, 2018)
4	Hızlı salımlı tablet	Teofilin (etkin madde yükleme oranı: %50) 	HPC, TA, Na nişasta glik., Kroscarmeloz Na, krospovidon	Autodesk® 3ds Max-Design 2016 ver. 18.0 & Makerware ver. 2.4.0.17	HAAKE Mini CTW Çift vidalı HME. Ekst. sıcaklığı: 120°C Tork: 0,8 Nm. Fil. çapı: 1,75 mm	MakerBot Replicator 2X Rezolüsyon: Standard Ekst. çap: 0,4 mm Infill: %100 Tabaka yitkisi: 300 µm	(Arafat ve diğerleri, 2018)

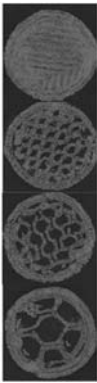
Çizelge 2.11. (devam) FDM tekniği ile ilaç üretimi üzerine yapılmış literatür çalışmaları

No	Çalışma Amacı	Etkin Madde	Yardımcı Maddeler	Tasarım Yazılımı	Filament Ekstrüzyonu	3DP Baskı	Referans
5	Hızlı salımlı tablet	Haloperidol (etkin madde yükleme oranı: %10 ve %20) 	Kollidon® VA64, Kollicoat IR, HPMC ve HPMCAS MG	https://www.tinkercad.com	Thermo Fisher Scientific, çift vidalı HME Ekst.sıc.: 170°C Vida hızı: 200 rpm Fil. çapı: 1,55 mm	MakerBot Replicator 2X Rezolüsyon: Standard Ekst.sıc.: 210 °C Ekst.çap: 0,4 mm Infill: %60 ve %100 Tabaka yüks.: 100 µm	(Solanki, Tahsin, Shah ve Serajuddin, 2018)
6	Hızlı salımlı tablet	Ramipril (etkin madde yükleme oranı: %3) 	Kollidon® VA64, Kollidon® 12PF, PEG 1500, Mannitol Mg-karbonat	AutoCAD 2014 ve Makerware v. 2.4.1	Noztek tek vidalı ekstrüder Ekst.sıc.: 65-70°C Ekst. hızı: 15 rpm Fil. çapı: 1,3 mm	MakerBot Replicator 2X Rezolüsyon: Standard Ekst. sıc.: 90 °C Ekst. çap: 0,4 mm Infill: %100 Tabaka yüks.: 200 µm	(Kollamaram ve diğerleri, 2018)
7	Hızlı ve uzatılmış salımlı tablet	Teofilin (etkin madde yükleme oranı: %50) 	Eudragit RL, RS ve E, HPC SSL	Autodesk 3ds Max Design 2012 software ver. 14.0 ve MakerWare Ver.2.4.0.17	HME Thermo Scientific HAAKE MiniCTW çift vidalı ekstrüder Karıştırma sıc.: 125-130°C Ekst.sıc: 110-120°C Tork: 0,6 Nm Fil. çapı: 1,5 mm	MakerBot Replicator 2X Ekst. sıc.: 140-170°C Tabla sıc.: 60-90°C	(Pietrzak, Isreb ve Allman, 2015)
8	Kontrollü salımlı tablet	API: APAP (etkin madde yükleme oranı: %10) 	Soluplus®, HPMC	Microsoft 3D Builder & CURA	Thermo Fisher Scientific, çift vidalı HME Isıtma zonu: L/D 40, 8 bölme Ekst.sıc.: 160°C Vida hızı: 50 rpm Fil. çapı: 2 mm	Prusa i3 3D desktop printer, Ekst. çap: 0,4 mm Ekst. sıc.: 200°C Tabla sıc.: 50°C Infill: %100 Tabaka yüks.: 100 µm	(Zhang ve diğerleri, 2017)
9	Kontrollü salımlı tablet	Parasetamol (etkin madde yükleme oranı: %4) 	PVA	AutoCAD 2014 & Makerware ver. 2.4.1	Filabot tek vidalı ekstrüder Ekst.sıc.: 180°C Ekst. hızı: 35 rpm Fil. çapı: 1,75 mm	MakerBot Replicator 2X Rezolüsyon: Standard Ekst. sıc.: 180 °C Infill: %100 Tabaka yüks.: 200 µm	(Goyanes ve diğerleri, 2015c)

Çizelge 2.11. (devam) FDM tekniği ile ilaç üretimi üzerine yapılmış literatür çalışmaları

No	Çalışma Amacı	Etkin Madde	Yardımcı Maddeler	Tasarım Yazılımı	Filament Ekstrüzyonu	3DP Baskı	Referans
10	Kontrollü salımlı tablet	Budesonit (etkin madde yükleme oranı: %4) 	PVA, Eudragit L100	AutoCAD 20141 & Makerware ver. 2.4.1	Noztek tek vidalı ekstrüder Ekst.sıc.: 170 °C Ekst. hızı: 15 rpm Fil. çapı: 1,75 mm	MakerBot Replicator 2X Rezolüsyon: Standard Ekst. sıc.: 190-220 °C Infill: %100 Tabaka yüks.: 200 µm	(Goyanes ve diğerleri, 2015b)
11	Kontrollü salımlı tablet	Hidroklorotiyazid (etkin madde yükleme oranı: %6) 	PVA, PLA, Mannitol	AutoCAD 20141 & Makerware ver. 2.4.1	Filabot tek vidalı ekstrüder Ekst.sıc.: 170 °C Ekst. hızı: 35 rpm Fil. çapı: 1,75 mm	MakerBot Replicator 2X Rezolüsyon: Standard Ekst. sıc.: 200-220 °C Tabla sıc.: 65 °C Infill: %100 Tabaka yüks.: 300 µm	(Gioumouxzis ve diğerleri, 2017)
12	Kontrollü salımlı tablet	5-aminosalisilik asit (5-ASA) and 4-aminosalisilik asit (4-ASA) (etkin madde yükleme oranı: %0,001 ve %0,236) 	PVA	AutoCAD 20141 & Makerware ver. 2.4.1	Hazır filamentler, etkin maddenin etanoldeki çözeltisi içinde oda sıcaklığında 24 saat bekletilmiş, ardından filamentler kurutulmuştur. Fil. çapı: 1,75 mm	MakerBot Replicator 2X Rezolüsyon: Standard Ekst. sıc.: 210 °C Tabla sıc.: 65 °C Infill: %10-%50-%90 Tabaka yüks.: 200 µm	(Goyanes, Buanz, Hutton, Gaisford ve Basit, 2015a)
13	Kontrollü salımlı tablet	Izoniazid ve rifampisin B (etkin madde yükleme oranı: %70) 	PEO, PLA, PVA	2.3. doDU design ve Consol Multiphysics ver.5.1.	DSM Explore® Çift vidalı HME Ekst.sıc.: 80 °C Ekst. hızı: 30 rpm Fil. çapı: 0,7-0,8 mm	Ultimaker 3, Extended Ekst. sıc.: 210-225 °C Tabla sıc.: 60 °C Baskı hızı: 35 mm/sn Infill: %100 Tabaka yüks.: 200 µm	(Genina ve diğerleri, 2017)
14	Kontrollü salımlı tablet	Parasetamol (etkin madde yükleme oranı: %33) 	PVA	Slicer software (version 1.2.9)	1,75 mm çapında hazır filamentler kullanılmıştır.	Creator Pro, FlashForge Ekst. sıc.: 180-200 °C Ekst. çap: 0,3 mm Infill: %100 Tabaka yüks.: 150 µm	(Zhao, Xu, Wang ve Wang, 2018)

Çizelge 2.11. (devam) FDM tekniği ile ilaç üretimi üzerine yapılmış literatür çalışmaları

No	Çalışma Amacı	Etkin Madde	Yardımcı Maddeler	Tasarım Yazılımı	Filament Ekstrüzyonu	3DP Baskı	Referans
15	Kontrollü salımlı tablet	Prednisolon (etkin madde yükleme oranı: %2) 	PVA	Autodesk 3ds Max Design 2012	Hazır filamentler, etkin maddenin metanolde doymuş çözeltisi içinde 30°C'de 24 saat bekletilmiş, ardından filamentler kurutulmuştur. Fil. çapı: 1,75 mm	MakerBot Replicator 2X Rezolüsyon: Standard Ekst. sic.: 230 °C Tabla sic.: 20 °C Infill: %100 Tabaka yüks.: 200 µm	(Skowryra ve diğerleri, 2015)
16	Kontrollü salımlı tablet	Metformin ve teofilin (etkin madde yükleme oranı: %20 ve %60) 	Üretan	SketchUp™ ve Makerbot Desktop ver.3.3.	Thermo Fisher Prism Eurolab 16 Çift vidalı ekstrüder Ekst.sic.: 100-180 °C Ekst. sic.: 50 °C Ekst. hızı: 100 rpm Fil. çapı: 1,70 mm.	MakerBot Replicator 2X Rezolüsyon: Standard Ekst. sic.: 100-180 °C Tabla sic.: 50 °C Infill: %100 Tabaka yüks.: 300 µm	(Verstraete ve diğerleri, 2018)

2.8. Katı Dispersiyonlar

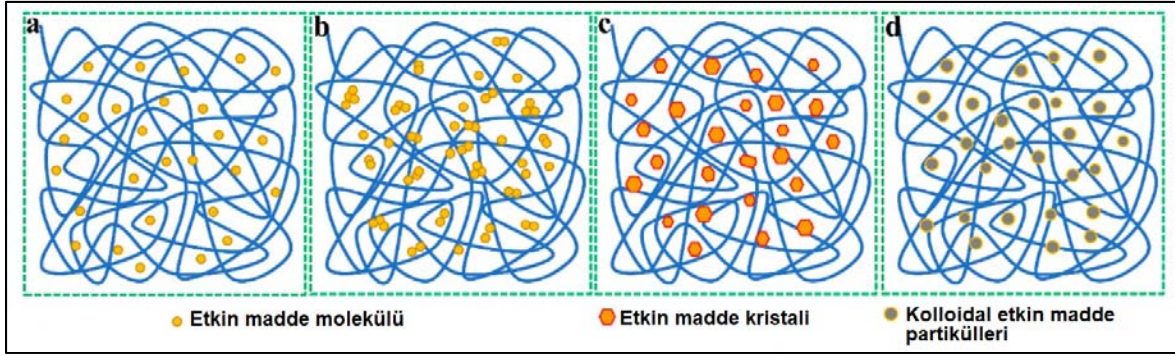
Son yıllarda geliştirilen etkin maddelerin pek çoğu düşük çözünme ve çözünürlüklü etkin maddelerdir. Etkin maddenin çözünme hızı özellikle kısa absorpsiyon penceresi olan etkin maddelerin biyoyararlanımı için çok önemlidir. Bu etkin maddeler çözünmeleri için yeterli süre geçmediği için absorpsiyon bölgesinden emilmeden geçebilmekte, bu durum da biyoyararlanımın düşmesine neden olmaktadır (Zhang, Xing, Zhao ve Ma, 2018).

İlaç geliştirme çalışmalarında suda çözünürlüğü düşük etkin maddelerin çözünürlüklerini, dolayısıyla biyoyararlanımını artırmak için mikronizasyon, nanokristalizasyon, tuzunu oluşturma, siklodekstrin inklüzyon kompleksi, ko-kristalizasyon, miseller çözünürlük, katı dispersiyonlar ve nanopartiküller içersine enkapsülasyon gibi çeşitli yaklaşımlar denenmektedir (Zhang ve diğerleri, 2018).

Farmasötik geliştirme çalışmalarında tüm dispersiyon sistemleri (süspansiyonlar, kolloidal sistemler, çözeltiler) içerisinde katı dispersiyonlar en çok tercih edilen ve düşük çözünürlüklü etkin maddelerin çözünürlük ve biyoyararlanımını artırmak için üzerinde çalışılan dispersiyon sistemleridir. Günümüzde katı dispersiyon üretimlerin ölçek büyütme çalışmaları oldukça kolaydır. Piyasada katı dispersiyon teknikleri ile üretilmiş, tablet, kapsül, granül gibi ilaç şekillerinde çok sayıda bitmiş ürün bulunmaktadır. (Zhang ve diğerleri, 2018).

Katı dispersiyonlar, etkin maddelerin çözünürlük, çözünme ve biyoyararlanımını artırmak için hazırlanan, bir bileşenin taşıyıcı içinde disperse edildiği ve sistemin katı olduğu sistemlerdir. Bu sistemlerde formülasyon ve üretim yöntemine bağlı olarak ilaç polimer içinde moleküler olarak disperse olabilir, amorf ya da kristal yapıda olabilir veya kolloidal şekilde bulunabilir (Şekil 2.15) (Zhang ve diğerleri, 2018) .

Katı dispersiyonlarda etkin maddenin metastabil formda bulunması çözünmeyi hızlandırır. Aynı zamanda özellikle sürfaktan ya da emilim artırıcı maddelerin bulunduğu katı dispersiyon formülasyonlarında gastrointestinal emilim de artmaktadır (Zhang ve diğerleri, 2018). Aynı şekilde taşıyıcı da kristal ya da amorf yapıda bulunabilmektedir. İlacın bulunma şekli, katı dispersiyonun çözünürlük ve stabilitesi üzerinde etkilidir (Simoes, Pinto ve Simoes, 2019).



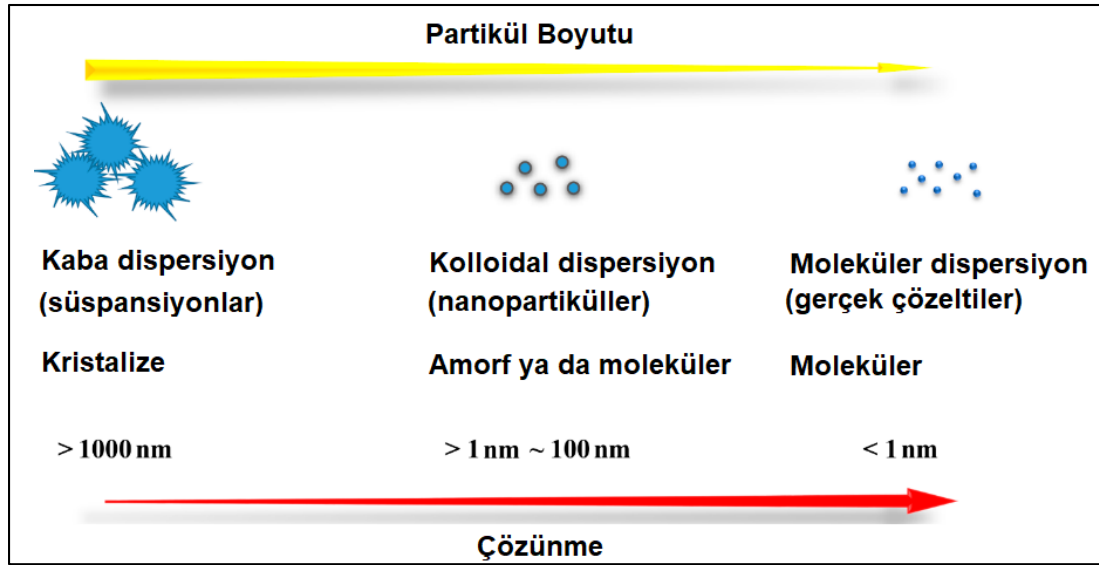
Şekil 2.15. Katı dispersiyonlarda etkin maddenin bulunma şekilleri (a) Katı çözelti oluşturan moleküler dağılım, (b) Amorf dispersiyon oluşturan amorf durum, (c) Basit dispersiyon oluşturan kristal durum, (d) Kolloidal dispersiyon oluşturan kolloidal durum

2.8.1. Katı dispersiyonların çözünürlük ve biyoyararlanım artırma mekanizmaları

Etkin maddelerin gastrointestinal kanaldan emilimi ve biyoyararlanımı için ön koşul çözünmedir. BCS Sınıf II etkin maddeler için çözünmeyi artırarak biyoyararlanımı artırmak mümkünken BCS Sınıf IV etkin maddeler için bu yeterli olmamakta, hem çözünme hem absorpsiyon bariyerinin aşılması gerekmektedir. Bu doğrultuda katı dispersiyonların çözünürlük ve biyoyararlanım artırma mekanizmaları aşağıdaki gibi açıklanabilmektedir:

1. *Zayıf kimyasal bağlar ve Fiziksel bağlar ile çözünürlüğün artırılması:* Bir etkin maddeyi bir taşıyıcı içerisinde dağıtmak, moleküller arası kuvvetlerin üstesinden geldiği için çözünmeyi artırmak için etkili bir yoldur. Etkin maddenin çözünmesi, etkin madde molekülleri arasında etkileşimlerin kırılıp bunun yerine etkin madde-çözünme ortamı arasında etkileşimlerin kurulması anlamına gelmektedir. Eğer etkin madde molekülleri arasındaki etkileşim kuvveti zayıf ise bu bağların kırılması daha kolay olacak, etkin madde-çözünme ortamı arasında etkileşim daha kolay kurulabilecektir. Bu sayede etkin madde çözünmesi hızlanacaktır. Dispersiyon sistemleri kovalan bağlar içermez, bunun yerine genellikle geri dönüşlü aglomeratların oluşabileceği van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler ve/veya fiziksel bağlanmalar rol oynar. Katı dispersiyonlarda meydana gelen etkin madde-taşıyıcı arasındaki etkileşimler, etkin maddenin molekülleri arasındaki etkileşimi azalttığı için çözünme üzerinde olumlu etkisi olmaktadır (Zhang ve diğerleri, 2018).

2. *Partikül boyutunun düşürülmesi ile çözünürlüğün artırılması*: Düşük çözünürlüğe sahip etkin maddeler kaba dispersiyon sistemlerinde genellikle düşük hızda çözünmektedir. Düşük çözünürlüklü etki maddelerin ince dispersiyonları ile çözünme artırılabilir. Partikül boyutuna göre dispersiyonlar genellikle Şekil 2.16'daki gibi üç grup altında incelenebilmektedir (Zhang ve diğerleri, 2018).

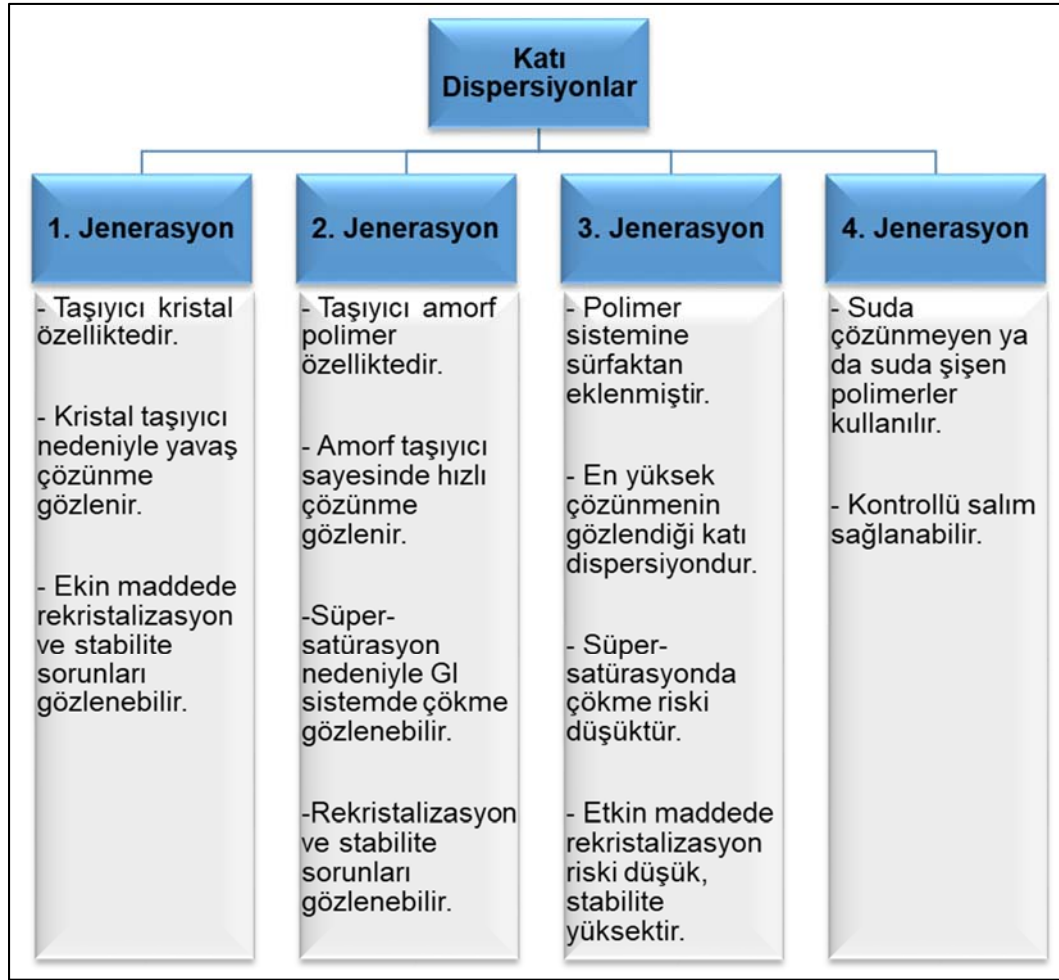


Şekil 2.16. Partikül boyutuna göre katı dispersiyonların gruplandırılması

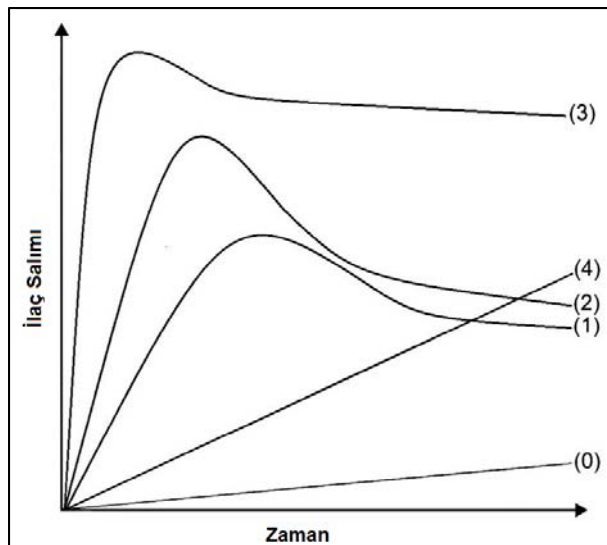
3. *Lipit yapıdaki maddeler ile emilimin artırılması*: Katı dispersiyon formülasyonlarında kullanılan lipit yapıdaki maddeler (örn. Gelucire® türevleri) hücre membranı ile etkileşim kurarak ve GI sistemde efflux transporterleri inhibe ederek absorpsiyonu artırabilmektedir (Zhang ve diğerleri, 2018).

2.8.2. Katı dispersiyonların sınıflandırılması

Katı dispersiyonlar genel olarak taşıyıcının kristal ya da amorf olmasına göre “kristal katı dispersiyonlar” ve “amorf katı dispersiyonlar” olmak üzere ikiye ayrılır. Bununla birlikte Şekil 2.17’de sunulduğu gibi dört jenerasyon altında incelenebilmektedir (Vo, Park ve Lee, 2013) (Vasconcelos, Sarmiento ve Costa, 2007). Jenerasyonlara ait temsili çözünme profili Şekil 2.18’de sunulmuştur (Vo ve diğerleri, 2013).



Şekil 2.17. Katı dispersiyonların dört jenerasyon olarak sınıflandırılması



Şekil 2.18. Katı dispersiyon jenerasyonlarına ait temsili çözünme profilleri (0) Saf etkin madde, (1) Birinci jenerasyon katı dispersiyon, (2) İkinci jenerasyon katı dispersiyon, (3) Üçüncü jenerasyon katı dispersiyon, (4) Dördüncü jenerasyon katı dispersiyon

Birinci jenerasyon

İlk defa Sekiguchi ve Obi tarafından 1961 yılında tarif edilmiştir (Vasconcelos ve diğerleri, 2007). Birinci jenerasyon katı dispersiyonlar “kristalin katı dispersiyonlar” olarak bilinmektedir. Bu dispersiyonlarda taşıyıcı kristal özelliktedir (örn. üre, sorbitol, mannitol), etkin madde kristal ya da amorf yapıda olabilir. Etkin maddenin kristalize olduğu dispersiyon tipine “kristalin katı çözelti” adı verilir (Vo ve diğerleri, 2013). Etkin madde ve taşıyıcı karışımının erime derecesi, etkin madde ya da taşıyıcının erime derecesinden düşükse bu karışımlara “ötektik karışımlar” adı verilir. Eğer taşıyıcı ve etkin maddenin erime dereceleri sabit ise “monotektik karışım” adı verilir (Vasconcelos ve diğerleri, 2007).

Şeker yapısındaki maddeler yüksek erime derecesine sahip oldukları için eritme yöntemi ile katı dispersiyon yapılmasına uygun değildir. Üre ise suda ve pek çok organik çözücünde şeker türevlerine göre daha yüksek çözünürlüğe sahip olması nedeniyle daha çok tercih edilen bir taşıyıcıdır. Yapılan çalışmalarda çözünme davranışı artırma mekanizmalarının partikül boyutunu küçültme, ıslanmayı artırma ve polimorfik yapıyı değiştirme olabileceği gösterilmiştir. Kristalin katı dispersiyonların başlıca sakıncası, yüksek termodinamik stabiliteye sahip taşıyıcıların, amorf taşıyıcılara nazaran çözünmeyi yavaşlatmasıdır (Vo ve diğerleri, 2013).

İkinci jenerasyon

İkinci jenerasyon katı dispersiyonlarda taşıyıcı çoğunlukla polimer olup amorf yapıdadır. Amorf katı dispersiyonlar etkin maddenin fiziksel yapısına bağlı olarak “amorf katı çözeltiler (camsı çözeltiler)” ve “amorf katı süspansiyonlar” olmak üzere iki grupta incelenmektedir (Vo ve diğerleri, 2013) (Vasconcelos ve diğerleri, 2007).

- Amorf katı çözeltilerde ilaç amorf taşıyıcı içinde tamamen dağılmıştır ve moleküler seviyede homojen karışım meydana gelmiştir (Vo ve diğerleri, 2013). Bu sistemlerde etkin madde ve taşıyıcı etkileşim enerjisi çok yüksektir ve sistem tek fazlı gerçek bir çözelti gibi davranır (Vasconcelos ve diğerleri, 2007).
- Amorf katı süspansiyonlarda ise iki ayrı faz halinde bulunmaktadır. Etkin madde erime derecesi çok yüksek olduğunda ya da taşıyıcı içinde çözünürlüğü çok düşük olduğunda meydana gelmektedir (Vo ve diğerleri, 2013) (Vasconcelos ve diğerleri, 2007).

Bu sistemlerde etkin madde partikül boyutu moleküler seviyelere kadar düşebilmekte, taşıyıcı sayesinde çözündürülebilmekte ve ıslanabilirliği artmakta, bu sayede amorf katı dispersiyonlar meydana gelmektedir. Dolayısıyla ilaç salımı, taşıyıcının çözünmesine bağlı meydana gelmektedir (Vasconcelos ve diğerleri, 2007).

Etkin madde genellikle birden fazla durumda bulunabilmektedir (kısmen amorf, kısmen kristalin, kısmen çözünmüş, kısmen disperse). Amorf katı dispersiyonlarda etkin madde moleküler amorf ya da küçük kristal partiküller halinde disperse olabilmektedir ve bu nedenle amorf taşıyıcı içinde süpersatüre halde bulunabilmektedir. Bu duruma “zorlanmış çözünürlük” adı verilmektedir. Amorf taşıyıcılar aynı zamanda suda yüksek çözünürlüğe sahip olmaları nedeniyle etkin maddenin ıslanabilirliğini, dağılabilirliğini ve dolayısıyla çözünürlük ve çözünme özelliğini artırabilmektedir. Amorf taşıyıcılar aşağıdaki gibi olmaktadır (Vo ve diğerleri, 2013).

- Sentetik Polimerler: Povidon (PVP), polietilen glikol (PEG), krospovidon, polivinilpirolidon-ko-vinilasetat, poliakrilatlar.
- Doğal Polimerler: Hipromelloz, hipromelloz fitalat, hipromelloz süksinat, nişasta, şeker türevleri (trehaloz, sükroz, inülin)

Amorf taşıyıcılar arasında en fazla kullanılanlar Hipromelloz, PEG ve PVP olmaktadır. Diğer amorf taşıyıcılardan farklı olarak PEG yarı-kristal özelliktedir ve molekül ağırlığından bağımsız olarak çok düşük erime derecesi vardır ($< 65^{\circ}\text{C}$). Bu nedenle özellikle sıcaklığa hassas etkin maddeler için PEG çok uygun bir taşıyıcı olmaktadır. Bunun tersine PVP yüksek camsı geçiş sıcaklığına sahip olması nedeniyle eritme yöntemlerinde tercih edilen bir polimer değildir (Vo ve diğerleri, 2013).

Polimerlerin neredeyse tamamı organik çözücülerde çözündüğü için “çözücü uçurma” tekniği ile de katı dispersiyonları hazırlanabilmektedir. Polimerlerin zincir uzunluğu ve molekül ağırlıkları arttıkça genellikle sudaki çözünürlükleri düşmekte ve viskoziteleri artmaktadır. Yüksek viskoziteli polimerler etkin maddenin hazırlanma, saklama ve çözünmesi esnasında rekristalize olmasını engelleyebilmektedir. Bununla birlikte yüksek viskoziteli polimerler çözünmeyi yavaşlatmaktadır (Vo ve diğerleri, 2013).

Polimer seçiminde molekül ağırlığı önemli bir parametredir. Örneğin düşük molekül ağırlıklı PEG ile hazırlanan katı dispersiyonlar, yumuşak ve yapışkan yapıda iken yüksek molekül ağırlıklı PEG kullanımı çözünmeyi yavaşlatmaktadır (Vo ve diğerleri, 2013).

Polimer ve etkin madde arasında meydana gelebilecek etkileşim de polimer seçimi için önemli bir faktördür. Bazı etkin maddeler taşıyıcılarla hidrojen bağı kurabilmekte ya da plastikleştirici etki gösterebilmektedir. Bu etkileşimler neticesinde ilaç salımı ve stabilitesi değişebilmektedir. Yüksek miktarda hidrojen bağı kurulması, etkin maddenin amorf halde bulunmasını sağlayabilmektedir. Bazı enterik polimerlerle (Hipromelloz fitalat, Eudragit L) etkin maddenin midede çözünmesi engellenebilmektedir (Vo ve diğerleri, 2013).

Üçüncü jenerasyon

Amorf katı dispersiyonlarda ilaç salımı iyileştirilebilse de anlık artan yüksek çözünürlük ve süpersatürasyon kaynaklı gastrointestinal sistemde meydana gelebilecek çökme, biyoyararlanımı olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Bu durum özellikle şeker türevleri ile oluşturulan katı dispersiyonlarda geçerlidir. Bunun önüne geçmek için üçüncü jenerasyon katı dispersiyonlarda amorf taşıyıcının yanına sürfaktan ilave edilmektedir. Bu sayede (Vo ve diğerleri, 2013) (Vasconcelos ve diğerleri, 2007):

- Süpersatürasyon kaynaklı çökmelerin önüne geçilebilmektedir.
- Sürfaktanlar amfifilik yapıları sayesinde etkin maddelerin taşıyıcı içinde karışabilirliğini artırmakta, bu da tekrar kristalize olmasını engellemektedir.
- Süpersatüre sistemin biyoyararlanımı artmaktadır.
- Sürfaktanlar etkin maddelerin ıslanabilirliğini artırmakta ve miseller çözünürlük sağlamaktadır.
- Çözünme hızlanmaktadır.
- Bitmiş ürünün fizikokimyasal stabilitesi iyileşmektedir.

Bu amaçla kullanılan sürfaktanlar poloksamerler, Compritol® 888 ATO, Gelucire® türevleri, inutec SP1, Tween® 80, SLS ve Sükroz laurat olabilmektedir (Vo ve diğerleri, 2013). Amorf polimer olarak ise Soluplus® sıklıkla kullanılmaktadır (Vo ve diğerleri, 2013) (Vasconcelos ve diğerleri, 2007).

Dördüncü jenerasyon

Bu jenerasyon katı dispersiyonlarla düşük çözünürlüklü ve yarılanma ömürlü etkin maddelerin kontrollü salımı sağlanmaktadır. Bu amaçla sıklıkla kullanılan polimerler suda çözünmeyen etil selüloz, Eudragit RS, RL, hidroksipropil selüloz, Carbopol® ve PEO olmaktadır.

2.8.3. Katı dispersiyonlarda sıklıkla kullanılan yardımcı maddeler

Katı dispersiyonlarda kullanılan taşıyıcılar, etkin maddenin çözünme ve biyoyararlanımında oldukça büyük rol oynamaktadır. Düşük çözünürlüklü etkin maddeler için genellikle suda çözünürlüğü yüksek taşıyıcılar tercih edilmektedir (Zhang ve diğerleri, 2018). Taşıyıcı maddeler aşağıdaki şekilde üç grup altında incelenebilmektedir (Zhang ve diğerleri, 2018):

1. *Düşük molekül ağırlıklı taşıyıcılar* : Genellikle kristalin yapıdadır (örn. üre, mannitol, sakkaritler, organik asitler). Bu taşıyıcılarla katı dispersiyon hazırlanması için yüksek miktarda etkin madde ve çözücü gerekmektedir. İlâveten bu tip katı dispersiyonların stabilitesi düşüktür. Bazı durumlarda glukoz ve laktöz gibi taşıyıcılar GI sistemde yarışmalı olarak emilip etkin maddenin emilimini negatif etkileyebilirler.
2. *Polimerik taşıyıcılar*: Homopolimer taşıyıcılardır ve amorf yapıdadır (örn. PEG, PVP, HPMC). Düşük molekül ağırlıklı taşıyıcılara nazaran disperse edilebilme gücü daha yüksektir ve etkin maddelerin rekristalizasyonunu inhibe edebilir. Bu nedenle sıklıkla kullanılmaktadırlar. Bununla birlikte yüksek viskozite, plastisite ve higroskopisiteye sahip olmaları nedeniyle prosesleri zor olabilmektedir. Sürfaktan içermeyen polimer taşıyıcılar düşük çözünürlüklü etkin maddelerin emilimini artırmada genellikle yetersiz kalmaktadır.
3. *Sürfaktan taşıyıcılar* : Amfifilik kopolimer taşıyıcılardır ve yarı-kristalin yapıdadır (örn. poloksamer). Bu tip taşıyıcıların dağılabilirlikleri yüksektir. İlâveten GI sistemde efflux transporterları inhibe ederek etkin madde absorpsiyonunu da artırmaktadır. Bu amaçla amfifilik yapıda, çözücü özellikleri artırılmış, absorpsiyon artırıcı özellikte fonksiyonlu polimerler kullanılmaktadır (örn. PEGile polimerler, Gelucire® türevleri, Soluplus®).

Katı dispersiyonlarda sıklıkla kullanılan taşıyıcı madde örnekleri Çizelge 2.12’de sunulmaktadır (Zhang ve diğerleri, 2018).

Çizelge 2.12. Katı dispersiyonlarda sıklıkla kullanılan taşıyıcı örnekleri

Taşıyıcı Maddeler	Örnekler	Açıklama
Sakkaritler	Sükroz, Glukoz Laktoz, Dekstroz	Etkin maddenin taşıyıcı içinde dağılılabirliği normal seviyededir. Etkin maddenin absorpsiyonunda yüksek etkilidir.
Alkoller	Mannitol Sorbitol	Etkin maddenin taşıyıcı içinde dağılılabirliği normal seviyededir. Etkin maddenin absorpsiyonunda düşük etkilidir.
Polietilen glikol	PEG 4000 PEG 6000	Etkin maddenin taşıyıcı içinde dağılılabirliği yüksek seviyededir. Etkin maddenin ıslanabilirliğini ve çözünürlüğünü hem in-vivo hem de in-vitro koşullarda artırabilmektedir. İlâveten bu tip taşıyıcıların eritme işlemlerinde termoplastik özellikleri oldukça iyidir.
Povidon	PVP K15 PVP K30	Etkin maddenin taşıyıcı içinde dağılılabirliği yüksek seviyededir. Rekristalizasyon engelleyicidir.
Selüloz türevleri	HPMC HPC MC	Etkin maddenin taşıyıcı içinde dağılılabirliği yüksek seviyededir. Plastiklik ve higroskopisite düşüktür. Proses edilebilirlik yüksektir.
Poli (oksietilen-ko-oksipropilen)	Poloksamer 188 Poloksamer 407	Etkin maddenin taşıyıcı içinde dağılılabirliği yüksek seviyededir. Etkin maddenin çözünürlüğünü ve absorpsiyonunu artırır.
Karboksipolimetilen	Karbopol 947 Karbopol 907	İyonik polimerlerdir. Etkin maddenin taşıyıcı içinde dağılılabirliği yüksek seviyededir. İlaç salımı bağırsakta hızlıdır.
Polioksietilen stearat	Polioksietilen (40) stearat	Etkin maddenin taşıyıcı içinde dağılılabirliği yüksek seviyededir. Etkin maddenin çözünmesini artırmadığı için kullanımı sınırlıdır.
Doymuş yağlı makrogliceritler	Gelucire® türevleri	Fonksiyonel dispersiyon materyalleridir. Hem çözünme hem absorpsiyonu artırır.
Poli(vinilpirolidon-ko-vinil asetat)	PVP/VA	Etkin maddenin taşıyıcı içinde dağılılabirliği yüksek seviyededir. Higroskopisitesi düşüktür. Uygun sertlik, esneklik ve biyoadezyon özelliklerine sahiptir. Absorpsiyon artırıcı etkisi nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir.
Poli (vinil asetat-ko-vinil kaprolaktam-ko-etilen glikol)	Soluplus®	Katı çözelti oluşturmak için çok uygun yeni bir dispersiyon materyalidir. Üstün termoplastik özellikleri nedeniyle eritme yöntemlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Pek çok etkin madde ile katı çözelti oluşturabilmekte, çözünürlük, emilim ve biyoyararlanımı artırabilmektedir.

Gelucire® türevleri

Gelucire® türevleri non-iyonik, suda dağılabilen sürfaktan yapısında PEG-esterleridir. Küçük gliserid fraksiyonları ve serbest PEG yapısı sayesinde su ile temas ettiğinde kendi kendine emülsifiye olarak ince dispersiyonlar meydana getirmektedir. Tez çalışmasında çözünürlük ve emilimi artırmak amacıyla sürfaktan tipi bir taşıyıcı olan Gelucire® türevleri kullanılmıştır. Gelucire® türevleri yapısında amfifilik yapıda olan yağ asiti esterlerini bulunduran, lipid yardımcı maddelerdir. Yağ asitleri yapının apolar kısmını oluştururken ester bölgeleri yapının polar fonksiyonel gruplarıdır. Lipid yapısındaki bir maddenin hidrofilik polar grubu gliserol içerdiğinde, yapıya “gliserit” adı verilmektedir. Gliserit yapısındaki yağ ya da yağ asiti polioksietilen (polietilen glikol, PEG) ile reaksiyona girdiğinde ise yardımcı madde “polioksilgliserit” adını almaktadır. Hidrofilisite özelliklerine göre sıralaması

“Polioksilgliseritler > Polialkol Esterleri > Poligliseril Esterleri > Gliseritler” şeklinde olmaktadır. Tez çalışmasında incelenen Gelucire® türevlerine ait özellikler Çizelge 2.13’te özetlenmiştir (Gattefosse, 2015b):

Çizelge 2.13. Tez çalışmasında incelenen Gelucire® türevleri

Kimyasal Kategori	Marka ismi	Farmakope tanımlamaları (NF, EP)	Form	Erime derecesi (°C)	HLB		Fonksiyon
					Teorik	Deneyisel	
Polioksil gliseritler	Gelucire® 48/16	Polyoxyl stearate, Type I (NF), Polyethylene glycol monostearate (EP)	Pellet	46-50	16	12	Suda çözünen sürfaktan
	Gelucire® 44/14	Lauroyl Polyoxyl glycerides (NF/EP)	Pellet	42-47	14	11	Suda dağılan sürfaktan
	Gelucire® 50/13	Stearoyl Polyoxyl glycerides (NF/EP)	Pellet	46-51	13	11	

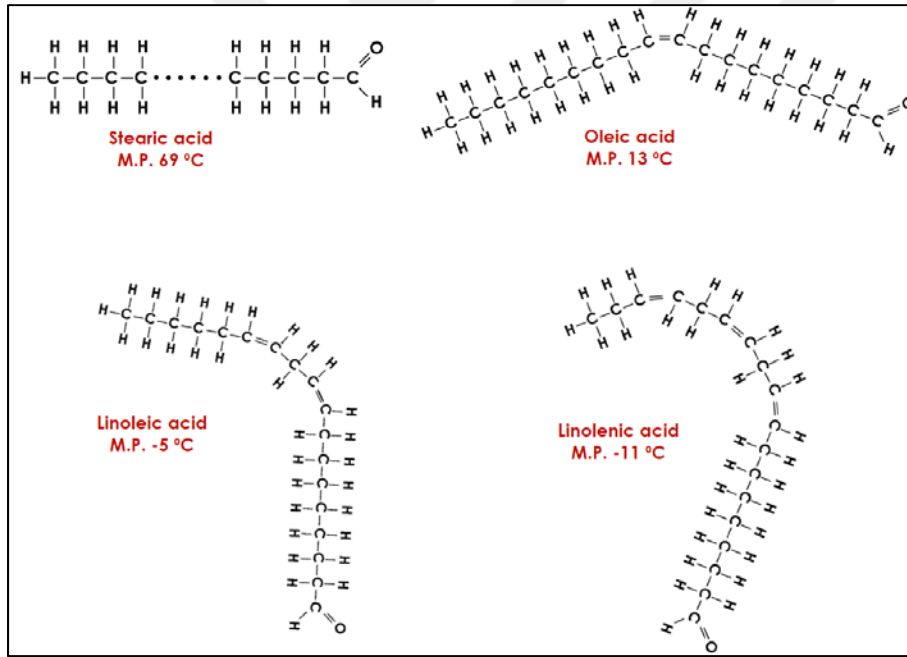
Yağ asitleri, Gelucire® gibi lipid yardımcı maddelerin yapı taşlarından biridir. Doğada farklı uzunluklarda ve doymunluklarda hidrokarbon zincirine sahip ve bir karboksilik asit ile sonlanan kimyasal yapılardır. Hidrokarbon zincir uzunluğu ve doymunluk derecesi, yardımcı maddenin erime derecesini, etkin maddeyi çözündürme kuvvetini ve etkin maddenin absorpsiyonunu artırma yeteneğini etkiler (Gattefosse, 2015b).

- Hidrokarbon zincir uzunluğu arttıkça erime derecesi yükselir. Etkin maddenin emilimi azalır. C8-C18 karbon zinciri uzunluğuna sahip esterler ile hızlı çözünen ve absorbe olan oral biyoyararlanımın artırıldığı formülasyonlar hazırlanabilirken C20-C22 üzerinde karbon zincir uzunluğuna sahip esterler ile absorpsiyon zayıf olmakta ve uzatılmış salımlı formülasyonlar hazırlanabilmektedir (Gattefosse, 2015b).
- Doymunluk (çifte bağ sayısı) arttıkça erime derecesi düşer. Etkin maddenin emilimi azalır (Gattefosse, 2015b).

Biyoyararlanımı artırdığı bilinen ve sıklıkla kullanılan bazı yağ asitlerine ait özet fizikokimyasal bilgiler Çizelge 2.14’te, yapısal farklar Şekil 2.19’da sunulmuştur (Gattefosse, 2015b).

Çizelge 2.14. Biyoyararlanımı artırdığı bilinen ve sıklıkla kullanılan yağ asitlerine ait özet fizikokimyasal bilgiler

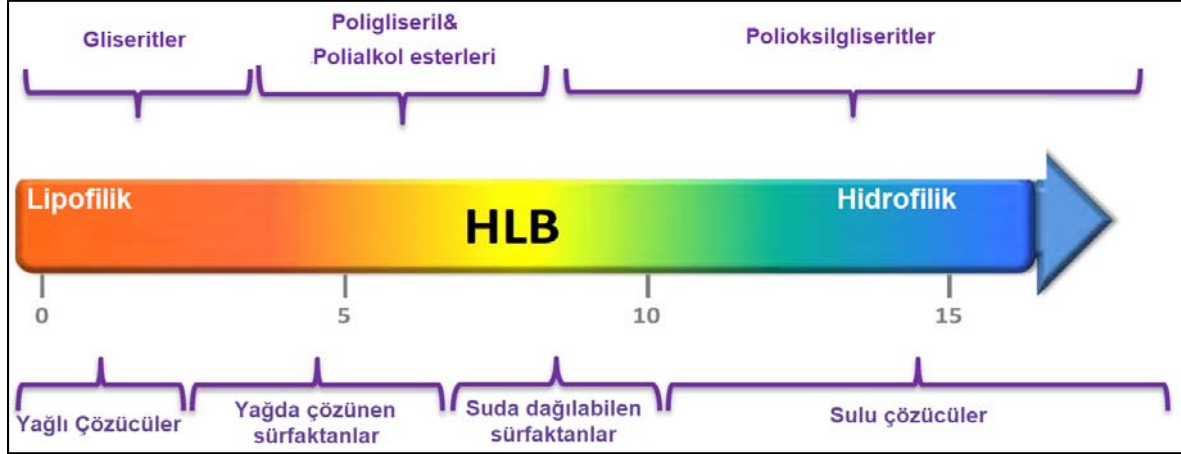
Kimyasal ismi	Hidrokarbon zincir uzunluğu: Doygunluk (Çifte bağ sayısı)	Erime Derecesi (°C)
Kaprilik	8:0	17
Kaprik	10:0	32
Laurik	12:0	45
Miristil	14:0	55
Palmitik	16:0	63
Stearik	18:0	69
Oleik	18:1	13
Linoleik	18:2	-5
Linolenik	18:3	-11



Şekil 2.19. Biyoyararlanımı artırdığı bilinen ve sıklıkla kullanılan yağ asitlerine ait yapısal farklar

Lipid yapıdaki maddelerin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan bir özellik, maddelerin HLB değerleridir (Hydrophilic / lipophilic balance). HLB değeri lipid yapıdaki yardımcı maddelerin bir formülasyon içerisindeki su faza ya da yağlı faza afinitelerini tanımlar. Lipid molekülün hidrofilitesi polar grubun tipine (gliserol, propilen glikol, PEG) ve esterifikasyon derecesine bağlıdır. Daha büyük polar gruplar, yardımcı maddenin daha polar özellik kazanmasını sağlamaktadır. İlaveeten monoesterler, diesterlerden

daha hidrofilik yapıdadır. Çözünürlük artırıcılık kuvvetlerine bağlı olarak sıralaması “ko-solvanlar > suda çözünebilen sürfaktanlar > suda dağılabilen sürfaktanlar > suda çözünmeyen sürfaktanlar” şeklinde olmaktadır. HLB değerine göre maddelerin suda ya da yağdaki çözücülük özellikleri Şekil 2.20’de sunulmuştur (Gattefosse, 2015b).



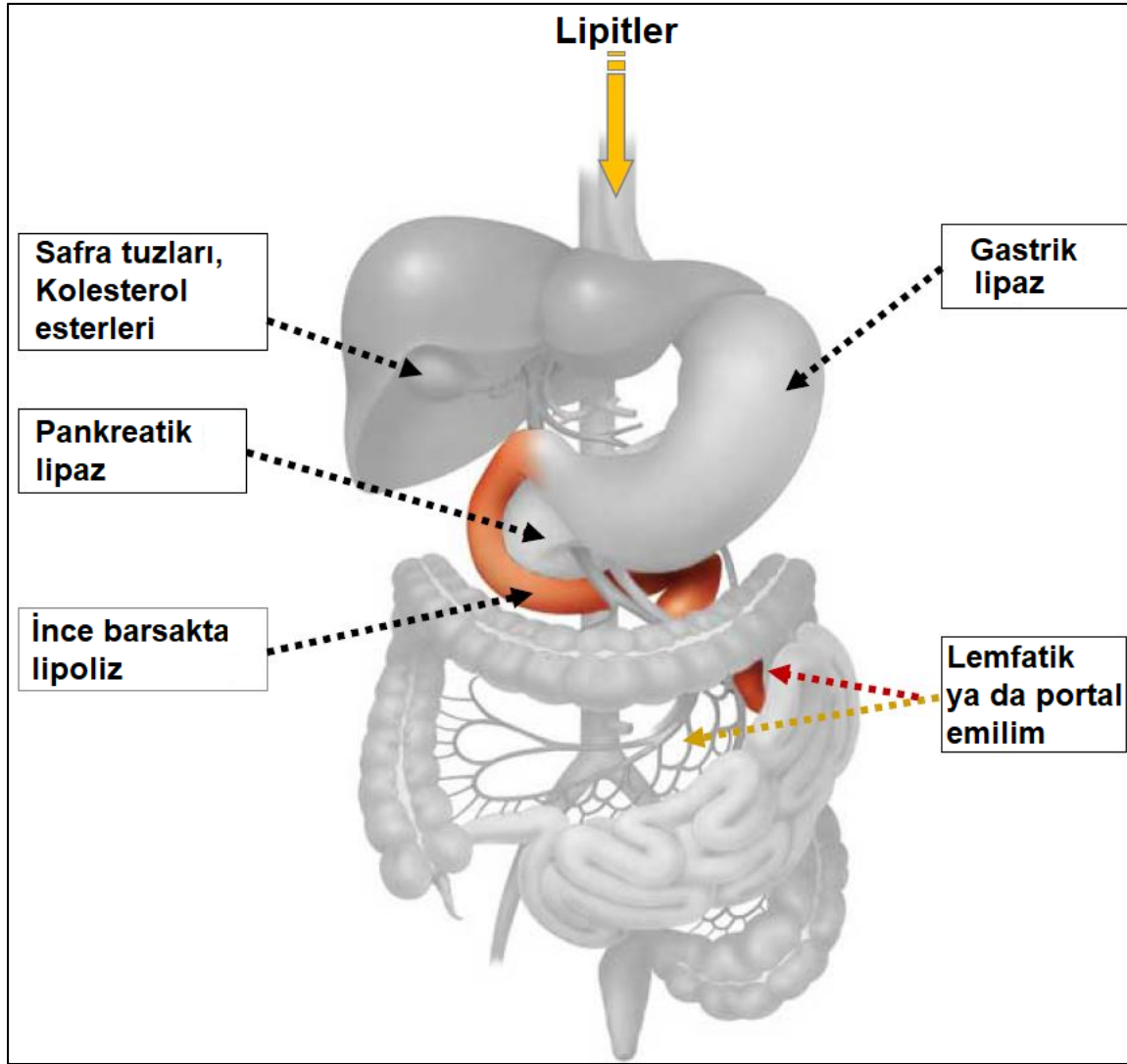
Şekil 2.20. HLB değerine göre maddelerin suda ya da yağdaki çözücülük özellikleri

Etkin maddelerin düşük oral biyoyararlanım göstermelerinin nedeni genellikle düşük çözünürlük, çözünme hızı, GI sistemden yetersiz absorpsiyonu ya da metabolik degradasyon olmaktadır. Yiyecek etkisi de düşük çözünürlüklü etkin maddeler için ilave bir problem olabilmektedir. Lipitlerin etkin maddelerin biyoyararlanımını artırma mekanizmaları aşağıdaki gibidir (Gattefosse, 2015b).

- *Etkin maddenin in-vitro çözünürlüğünün artması:* İlgili yardımcı maddenin, etkin maddenin GI sistem sıvılarında emülsifikasyon ve miselizasyon prosesleriyle çözünürlüğünü artırması istenmektedir. Biyoyararlanımı artırmak için tasarlanmış lipit formülasyonun amacı, etkin maddenin emilim bölgesine kadar çözünmüş halde kalmasını sağlamaktır. Bu nedenle formülasyon geliştirme aşamasında uygun HLB değerine sahip yardımcı maddelerle uygun çözücü maddenin tespit edilmesi önem taşımaktadır (Gattefosse, 2015b).
- *Etkin maddenin in-vivo çözünürlüğünün artması ve lipoliz:* Lipit yapıda maddelerin kullanıldığı formülasyonlarda ilaç mideye ulaştığında lipid sindirimi gastrik lipaz ile başlamaktadır. Gastrik lipaz enzimi normalde yüksek pH’da aktive olmaktadır ve bu nedenle sadece tokluk durumunda (pH 4.0-5.5) aktif haldedir. Dolayısıyla formülasyonda lipid yapıda bir madde bulunması, gastrik lipazın aktive olmasına ilaveten, safra ve

pankreatik sindirim salgılarının tetiklenmesini (safra tuzları, kolesterol esterleri, pankreatik lipaz) sağlamaktadır. Tüm bu enzimler sayesinde GI sistem tokluk durumuna benzer bir içeriğe sahip olmaktadır. Enzimler vasıtasıyla ilaç GI sistemde disperse olmakta, emülsifiye olmakta ve miselizasyon ile ince bağırsakta çözünürlüğü artmaktadır (Şekil 2.21).

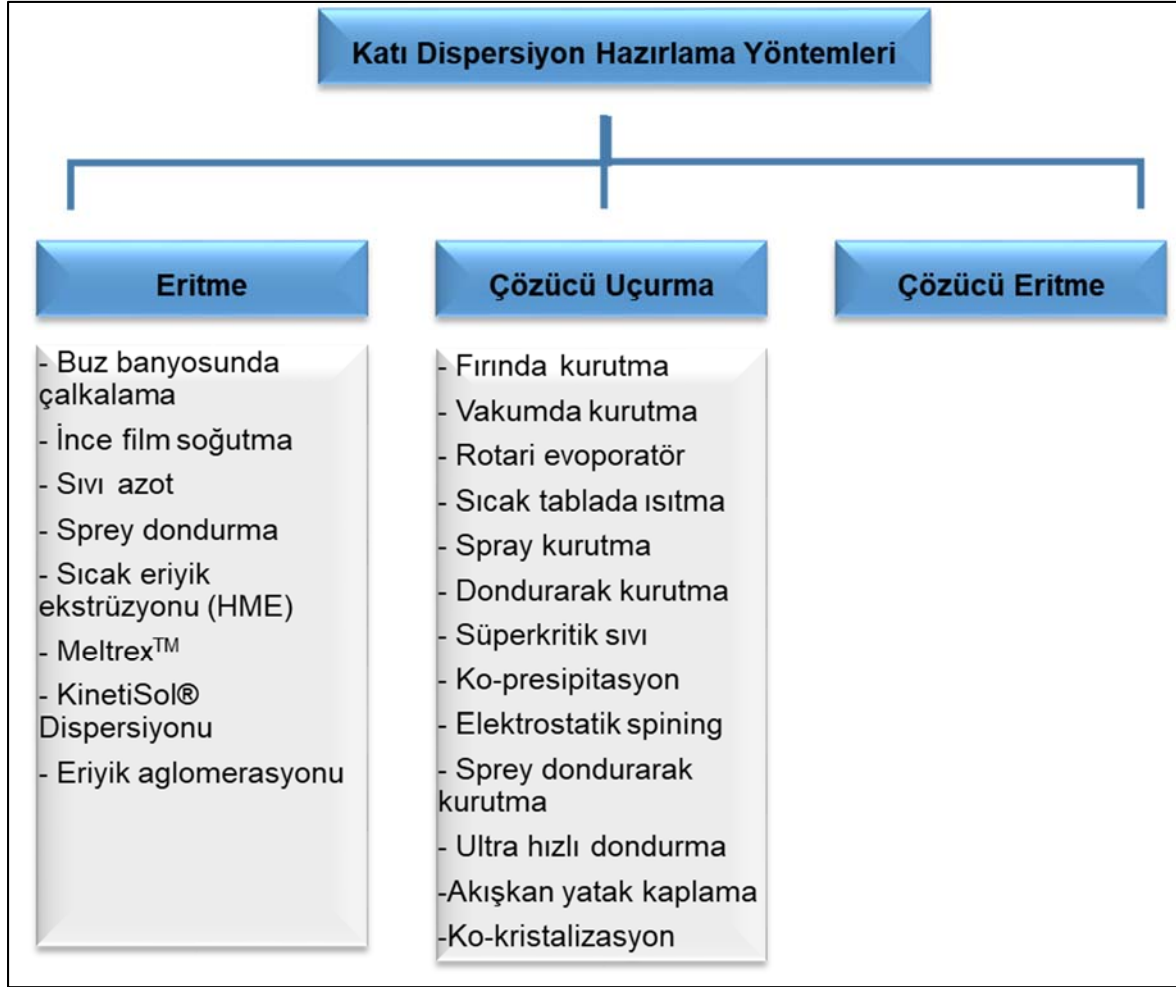
- *Intestinal permeabilite*: Yağ asitlerinin intestinal emilimi aşağıdaki gibi farklı kanallar aracılığıyla olabilmektedir:
 - o Hidrokarbon zinciri uzunluğu C12 ve altında olan yağ asitleri genellikle albumin bağlanma eğiliminde olmakta, bu da onları suda çözünebilir hale getirmektedir. Sonuç olarak pasif difüzyon vasıtasıyla ince bağırsak epitelyal hücrelerinden geçerek kan dolaşımına katılmakta ve karaciğere ulaşmadan önce portal vene geçmektedir (Gattefosse, 2015b).
 - o Hidrokarbon zinciri uzunluğu C14 ve üstünde olan yağ asitlerinde hidrofobik yapıları nedeniyle transporter hücrelerine afinite fazla olmaktadır. Bu durum lipoproteinler şeklinde tekrar-sentezlerine neden olmakta ve bu şekilde lenfatik yoldan emilmeleri mümkün olmaktadır. Doygun olmayan yağ asitlerinin özellikle lenfatik emilimle ilişkili şilomikron sentezini stimüle ettiği bilinmektedir. Bu yöntemle emilen etkin maddeler ilk-geçiş etkisine maruz kalmadığı için üstünlüklüdür (Gattefosse, 2015b).
 - o Lipoliz ve meydana gelen kolloidal dispersiyon etkin maddelerin lumene afinitesini artırarak permeabilitesini artırmaktadır. Bazı durumlarda epitelyal sıkı geçişlerin (tight junction) açılmasını sağladığını, efflux transportörleri inhibe ettiğini ve membran fluiditesini artırdığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Gattefosse, 2015b).



Şekil 2.21. Gastrointestinal sistemde lipidlerin enzimatik sindirimi ve emilimi

2.8.4. Sıcak eriyik ekstrüzyonu (HME) ile katı dispersiyonların hazırlanması

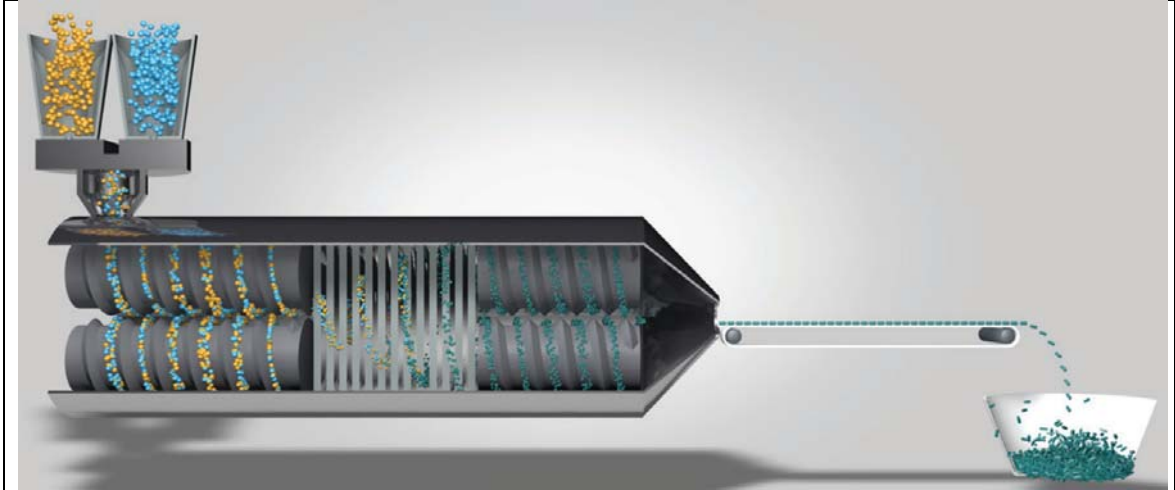
Katı dispersiyon hazırlama yöntemleri genel olarak eritme yöntemleri, çözücü yöntemleri ve çözücü eritme yöntemleri şeklinde üç grup halinde incelenmektedir (Şekil 2.22) (Vo ve diğerleri, 2013) (Vasconcelos ve diğerleri, 2007). Optimum yöntem seçiminde etkin madde ve taşıyıcıların fizikokimyasal özellikleri çok önemlidir. Sıcak eriyik ekstrüzyonu (HME) endüstriye uygulanabilir olması nedeniyle genellikle tercih edilen bir yöntemdir (Vo ve diğerleri, 2013 ; Ozguney, 2009).



Şekil 2.22. Katı dispersiyon hazırlama yöntemleri

Sıcak eriyik ekstrüzyonu (HME, Hot melt extrusion)

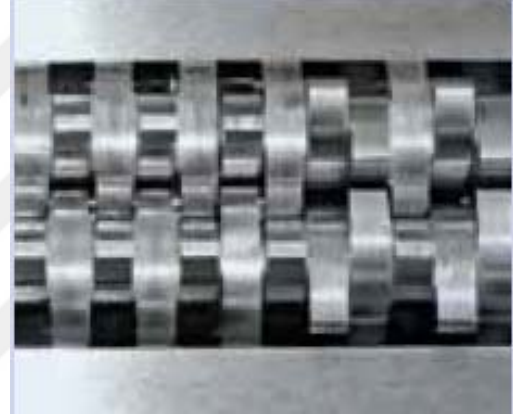
Son yıllarda HME yöntemi endüstriye uygunluk ve ölçek büyütmedeki kolaylıkları sayesinde en sık kullanılan katı dispersiyon hazırlama yöntemi olmuştur. Farmasötik endüstride ilk defa 1980 yıllarında kullanılmaya başlanmıştır (Zhang ve diğerleri, 2018). Bu yöntemde taşıyıcı ve etkin madde birlikte karıştırılmakta, ısıtılmakta, eritilmekte, homojenize edilmekte ve tabletler, pelletler ya da filamentler şeklinde ekstrüde edilmektedir. Karıştırma işlemi ısıtılmış dönen vidalar ile sağlanmakta, bu sayede etkin maddenin erimiş polimer içinde homojen dispersiyonu elde edilmektedir (Vo ve diğerleri, 2013). Tipik bir çift vidalı HME cihazının iç görünümü ve kullanılan bazı vida tipleri Şekil 2.23'te sunulmuştur.



HME cihazının iç görüntüsü (Dow, 2020)



İlerletici vidalar (BASF, 2012:10-100)



Ezici vidalar (BASF, 2012:10-100)

Şekil 2.23. HME cihazı ve kullanılan vida tipleri

Formülasyonlarında genellikle etkin madde, eriyebilen bir polimer, plastikleştiriciler ve diğer yardımcı maddeler bulunmaktadır. Erime hızı daha çok polimerin fiziksel ve reolojik özelliklerine bağlı olmaktadır. Polimerler amorf ve düşük viskoziteli ise erime hızı daha yüksek olmaktadır. Karışılabilir içeriklerden oluşan HME katı dispersiyonlarında genellikle çözünme profile yüksek olan amorf katı dispersiyonlar oluşmaktadır. Bu yöntem ile hızlı salımlı sistemler, kontrollü salımlı sistemler, pelletleri implantlar, transdermal ilaç veriliş sistemleri, oküler insertler gibi çok çeşitli ilaç şekilleri üretilebilmektedir (Vo ve diğerleri, 2013). 3DP yöntemlerinden FDM yönteminin temeli de HME tekniğidir. Dünya piyasasında eritme metodu ile üretilmiş ve ruhsatlanmış pek çok ürün bulunmaktadır. Oral kullanılan bazı ürün örnekleri Çizelge 2.15'te sunulmuştur (Simoes ve diğerleri, 2019) (Vo ve diğerleri, 2013).

Çizelge 2.15. Eritme metodu ile üretilmiş ve ruhsatlandırılmış oral kullanılan dünya piyasasından ürün örnekleri

Piyasa İsmi	Firma	Etkin Madde(ler)	Endikasyon	Taşıyıcı Tipi	Açıklama
Adalat SL	Bayer	Nifedipin	Antianjinal ajan	HPMC/PEO	Kontrollü salım
Afeditab CR	Alkermes Pharma	Nifedipin	Antianjinal ajan	Poloxamer /PVP	Tablet
Belsomra (2014, USA)	Merck	Suvoreksant	Insomnia	Kopovidon	BA artırmak için hazırlanmış bir amorf dispersiyon
Cesamet	Meda Pharm.	Nabilon	Antiemetik	PVP	Katı dispersiyon tablet.
Certican	Novartis	Everolimus	İmmünosupresan	HPMC	Tablet
Covera-HS	Pfizer	Verapamil HCl	Hipertansiyon	HPC	Eriyik granülasyon
Crestor	AstraZeneca	Rosuvastatin	Antilipemik	HPMC	Tablet
Eucreas	Novartis	Vildagliptin/ metformin HCl	Diyabet tip 2	HPC	Eriyik granülasyon
Fenoglide	Life Cycle Pharma	Fenofibrat	Dislipidemi	PEG 6000	Katı dispersiyon tablet
Gris-PEG	Penidol Ph.	Griseofulvin	Onikomikoz	PEG	Kristalin dispersiyon tablet
Isoptin SR-E	Abbott	Verapamil	Hipertansiyon	HPC/HPMC	Tablet
Kaletra	Abbott	Lopinavir/ritonavir	HIV	Kopovidon	Amorf disp.tablet. Meltrex™ tekniği ile üretilmiştir.
Maviret (2017, EU), Mavyret (2017, USA)	AbbVie	Glesaprevir/ pibrentasvir	Hepatit C virus	Kopovidon, vitamin E, PEG süksinat	İki etkin madde için iki ayrı amorf katı dispersiyon.
Norvir	Abbott	Ritonavir	HIV	PEG-gliserit	Amorf disp.. Meltrex™ tekniği ile üretilmiştir.
Noxafil	Merck	Posakonazol	Antifungal	HPMCAS	Amorf dispersiyon
Nucynta	Janssen	Tapentadol	Ağrı kesici	PEO/HPMC/PEG	Kontrollü salım
Nurofen Meltlets lemon	Reckitt Benckiser Healthcare	Ibuprofen	Analjezik	HPMC	Eriyik granülasyon
Onmel	Merz	Itrakonazol	Onikomikoz	HPMC	Amorf dispersiyon
Opana ER	Endo Pharm.	Oksimorfon HCl	Ağrı kesici	PEO/HPMC/PEG	Kontrollü salım
Palladone	Purdue Pharma	Hidromorfon HCl	Ağrı kesici	HPMC/ etilselüloz	Kontrollü salım
Prograf	Astellas	Tacrolimus	İmmünsupr.	HPMC	Kapsül
Rezulin	Parke-Davis	Troglitazon	Diyabet	PVP	Amorf disp.tablet
Sporanox	Janssen	Itraconazole	Antifungal	HPMC	Kapsül
Venclyxto (2016, EU), Venclexta (2016, USA)	AbbVie	Venetoclaks	Kronik lenfositik lösemi	Kopovidon, Polisorbitat 80, koloidal silikon dioksit	Amorf dispersiyon
Viekirax (2014, EU)/ Technivie (2015, USA)	AbbVie	Ombitasvir, paritaprevir, ritonavir	Hepatit C virus	Kopovidon, vitamin E, PEG süksinat	Üç etkin madde için üç ayrı amorf katı dispersiyondur.
Zelboraf	Roche	Vemurafenib	Melanom	HPMCAS	Tablet
Zythromax	Pfizer	Azitromisin enterik kaplı multipartikül	Antibiyotik	Prejelatinize nişasta	Eriyik granülasyon

HPC: Hidroksipropil selüloz; PVP: Polivinilpolidon; HPMC: Hidroksipropil metilselüloz; PEG: Polietilen glikol; PEO: Polietilen oksit; HPMCAS: Hidroksipropil metilselüloz asetat süksinat

2.8.5. Katı dispersiyonlardan salım mekanizmaları

Hızlı salımlı katı dispersiyonlardan salım mekanizmaları genellikle aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır. Bu iki mekanizma genellikle birlikte meydana gelmektedir (Vo ve diğerleri, 2013).

1. *Taşıyıcı kontrollü salım*: Katı dispersiyon su içinde disperse olduktan sonra, taşıyıcılar hidrofilik yapıları nedeniyle genellikle çözünmekte ya da hızlıca suyu absorblamaktadır. Bu durum bazı durumlarda konsantre taşıyıcı jel tabakası meydana getirebilmektedir. Eğer ilaç bu jel tabakasında çözünürse ve bu tabakanın viskozitesi difüzyon bariyeri olabilecek ölçüde yüksekse, hız sınırlayıcı basamak taşıyıcıdan difüzyon olmakta ve bu mekanizma “*taşıyıcı kontrollü salım*” olarak isimlendirilmektedir. Bu sistemlerde “Taşıyıcı: Etkin madde” oranı arttıkça, çözünme yavaşlamaktadır (Vo ve diğerleri, 2013).
2. *İlaç kontrollü salım*: Eğer ilaç bu jel tabakasında çözünmezse çözünme profilini ilacın özelliği (polimorfik özellik, partikül boyutu, çözünürlük) kontrol etmektedir ve bu mekanizma “*ilaç kontrollü salım*” olarak isimlendirilmektedir. Bu sistemlerde “Taşıyıcı: Etkin madde” oranı arttıkça, çözünme hızlanmaktadır (Vo ve diğerleri, 2013).

2.8.6. Katı dispersiyonların üstünlükleri

- Katı dispersiyonlar ilaçların partikül boyutunu moleküler seviyelere kadar düşürebilirler. Diğer konvansiyonel partikül boyutu düşürme tekniklerinde etkin madde partikül boyutu 2-5µm'lere kadar düşürülebilmekte, bu partikül boyutu formülasyonda kolaylıkla aglomere olabilmekte ve bu nedenle çözünme ve stabilitede sorunlar yaratabilmektedir (Vo ve diğerleri, 2013).
- Katı dispersiyonlarda taşıyıcı ve etkin madde arasındaki etkileşim, aglomerasyonu engellemektedir. Bu sayede etkin madde süper doygun bir ortamdan salınmakta ve bu durum absorpsiyonu hızlandırmaktadır. Etkin madde super doygun ortamda çökse dahi, çökeltideki partikül boyutu <1µm boyutlarında olmakta ve çözünme diğer konvansiyonel yöntemlerle hazırlanmış mikropartiküllere göre oldukça hızlı olmaktadır (Vo ve diğerleri, 2013).
- Katı dispersiyonlar ile hazırlanan ilaç şekillerinin, çözünürlük artırmak için hazırlanan sıvı ilaç şekillerine göre hasta uyuncu daha yüksektir (Vo ve diğerleri, 2013).

- Katı dispersiyonların hazırlanma işlemi, diğer çözünürlük artırma yaklaşımlarına göre (tuz oluşturma, nanopartikül, nanoemülsiyon) daha kolay ve endüstriye uygulanabilir (Vo ve diğerleri, 2013).
- Katı dispersiyonlar etkin maddenin ıslanabilirliğini artırabilmekte, poroziteyi artırılabilir, polimorfik değişiklikler olabilmekte ve tüm bunlara bağlı olarak biyoyararlanım artabilmektedir (Vo ve diğerleri, 2013).
- Taşıyıcı molekülün hızlı çözünmesi ya da suyu absorbe etmesi, etkin maddenin ıslanabilirliğini artırabilmektedir. Pek çok polimer çözünürlük artırıcı olarak davranabilmektedir. Özellikle sürfaktan ya da emülgatör içeren katı dispersiyonlarda bu artış daha belirgindir. Islanabilirliğin artması çözünme ortamında etkin madde partiküllerinin aglomerasyonunu engellemekte ve çözünmenin artmasını sağlamaktadır (Vo ve diğerleri, 2013).
- Katı dispersiyonlar, özellikle çözücü uçurma yöntemi ile hazırlandıklarında yüksek poroziteli yapılar oluşturmaktadır. Hızlı uçurma, katı dispersiyon içerisinde kanallar oluşmasını sağlayabilmektedir. Bu sayede daha hızlı çözünme elde edilmektedir. Özellikle lineer polimerler ile daha yüksek poroziteli katı dispersiyonlar hazırlanabilmektedir (Vo ve diğerleri, 2013).
- Katı dispersiyonlarda etkin madde kristal formdan amorf forma geçirilerek çözünürlüğü ve biyoyararlanımı artırılabilir. Bununla birlikte pek çok yayında etkin maddenin katı dispersiyonda kristal halde bulunmasına rağmen fiziksel karışıma göre biyoyararlanımının oldukça artmış olduğu bilinmektedir. Etkin maddenin katı dispersiyon içerisinde kristal halde bulunduğu katı dispersiyonlarda rekristalizasyon gibi stabilite problemleri gözlenmemektedir (Ali ve diğerleri, 2010; Vo ve diğerleri, 2013; Yan ve diğerleri, 2012).

2.8.7. Katı dispersiyonlarda yaşanan zorluklar

- *Etkin maddenin rekristalize olması:* Katı dispersiyonlarla ilgili en çok bilinen problem, etkin maddenin saklama sürecinde amorf formdan rekristalize olması ve bu sebeple yaşanan biyoyararlanım problemidir. Etkin maddelerde rekristalizasyon için öncelikle çekirdeğin oluşması (*nucleation*), ardından bu kristalin büyümesi gereklidir. Bunun için ilaç moleküllerinin yeniden yerleşmesi ya da difüzyonu gerekmektedir. Bu nedenle moleküler mobilite etkin maddenin stabilitesinde önemli rol oynamaktadır. Moleküler mobilite aşağıdaki gibi iki grup altında incelenebilmektedir:

- o Global mobilite (α -relaksasyonu): Camsı geçiş gibi moleküler mobilitiyi ifade etmektedir. Camsı geçiş sıcaklığının 50°C altında α -relaksasyonu ihmal edilecek seviyededir.
- o Lokal mobilite (β -relaksasyonu): Molekülün bir parçasının hareketini tanımlamaktadır ve global mobilite ile karşılaştırıldığında daha kısa bir süre içinde gerçekleşmektedir. Camsı geçiş sıcaklığının 50°C altında β -relaksasyonu rekristalizasyondan sorumludur.
 - Ortamda su bulunması genellikle plastikleştirici etki göstermekte ve amorf maddelerin camsı geçiş sıcaklığını düşürmektedir. Bununla birlikte pek çok polimer higroskopik yapıda olduğu için su absorblamaktadır, bu da moleküler mobilitiyi artırabilmektedir. Dolayısıyla moleküler mobilite ve rekristalizasyon artmaktadır (Vo ve diğerleri, 2013).
 - Yüksek sıcaklık da moleküler mobilitiyi artırdığı için katı dispersiyonlarda rekristalizasyona neden olabilmektedir (Vo ve diğerleri, 2013).
- o Moleküler mobilitiyi azaltmak ve rekristalizasyonun engellenebilmesi için etkin maddeden daha yüksek camsı geçiş sıcaklığına sahip, aynı zamanda düşük higroskopisiteye sahip polimerler kullanılmaktadır (Vo ve diğerleri, 2013).
- Eritme yöntemi ile hazırlanan katı dispersiyonlarda yüksek sıcaklık kullanılması, termal olarak dayanıklı olmayan etkin madde ve yardımcı maddeler için stabilite sorunlarına neden olabilmektedir (Vo ve diğerleri, 2013).
- Çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan katı dispersiyonların başlıca problemlerinden biri, çözücü kalıntısı kalmasıdır (Vo ve diğerleri, 2013).
- Katı dispersiyonların ölçek büyütme problemleri de literatürde zorluk olarak olarak belirtilmiştir (Vo ve diğerleri, 2013).

2.8.8. Katı dispersiyonlarda yapılan kontroller

Katı dispersiyonlarla suda çözünmeyen etkin maddelerde çözünme artışı, standart çözünme yöntemleri ile tespit edilebilir. Bununla birlikte etkin maddelerin fiziksel durumu, etkin madde-taşıyıcı etkileşimi ve fizikokimyasal stabilitesinin de incelenmesi gerekmektedir. Bu amaçla sıklıkla kullanılan yöntemler ilerleyen sayfalarda açıklanmıştır (Vo ve diğerleri, 2013).

Diferansiyel taramalı kalorimetri (Medscape) ve Module DSC (MDSC)

Termal analitik yöntemlerin temel prensibi, etkin maddenin katı hal özelliklerinin ısıtma ve soğutma esnasındaki dinamik değişikliklerinin izlenmesidir. Bu amaçla en çok kullanılan

teknik DSC olmaktadır. Bu yöntemde erime sıcaklığı, camsı geçiş sıcaklığı ve kristalizasyona bağlı faz geçişlerine bağlı enerji değişiklikleri incelenebilmektedir. İlaveten bu özellikler kristalinite derecesinin hesaplanmasında kullanılabilmektedir. Bununla birlikte kristal oranı %2'nin altında ise DSC ile tespit edilmesi zor olmaktadır (Vo ve diğerleri, 2013).

Bir katı dispersiyon DSC termogramında etkin maddeye ait pikin gözlenmemesi, etkin maddenin tamamen amorf forma dönüştüğünü, stabilite süresince pik gözlenmemesi, rekristalizasyonun olmadığını göstermektedir (Vo ve diğerleri, 2013).

DSC parametrelerinden endoterm ile biyoyararlanım tahmini yapılan çalışmalar mevcuttur. Düşük endotermi sahip katı dispersiyonlarda biyoyararlanım daha yüksek olabilmektedir (Vo ve diğerleri, 2013).

MDSC yönteminde sıcaklık artışı DSC'deki gibi lineer değil, sinusoidal şekildedir. Bu sayede DSC analizi sırasında meydana gelebilecek faz ayrışmalarının önüne geçilebilmektedir. Bu yöntemde entalpik relaksasyon, buharlaşma, kristalizasyon, termal Dekompozisyon, camsı geçiş ve diğer erime olayları incelenebilmektedir (Vo ve diğerleri, 2013). MDSC yönteminin başlıca üstünlükleri daha hassas olması, ısı kapasitesinin direkt ölçülebilmesi ve zayıf camsı geçiş sıcaklıklarının tespitini kolaylaştırmasıdır (Vo ve diğerleri, 2013).

Toz X-ray difraksiyonu (PXRD)

Katı dispersiyonlarda kristal yapının aydınlatılmasında en sık kullanılan yöntemdir. Kristal özelliğin parmak izinin hassas bir şekilde incelenmesini sağlar. Bununla birlikte amorf bileşenlerde kristal yapı oranı %5'in altında olması durumunda PXRD başarılı sonuç verememektedir (Vo ve diğerleri, 2013).

Fourier dönüştürülmüş kızılötesi spektroskopisi (FTIR)

FTIR yöntemi etkin madde-taşıyıcı arasında moleküler etkileşimin incelendiği ve yaygın kullanımı olan bir yöntemdir. Özellikle katı dispersiyonlarda etkin madde ve taşıyıcı polimer arasında oluşan hidrojen bağlarının bitmiş ürün stabilitesi üzerinde etkisi yüksektir. Etkin madde ve polimerler arasında kurulan hidrojen bağları rekristalizasyonu önlemekte, bu da bitmiş ürün stabilitesini iyileştirmektedir (Vo ve diğerleri, 2013).

Termal gravimetrik analizi (TGA)

TGA yönteminde zaman ve sıcaklığa bağlı ağırlık değişimi incelenmektedir. Bu sayede katı dispersiyon içerisindeki maddeler arasında geçimsizlik olup olmadığı ve bitmiş ürün stabilitesi hakkında bilgi alınabilmektedir (Vo ve diğerleri, 2013).

Diğer yöntemler

Çözünürlük, çözünme hızı, stabilite ve mikroskopik yöntemlerle morfolojik incelemeler de katı dispersiyonların karakterizasyonunda kullanılmaktadır.

Mevcut yapılan çalışmalara ilaveten filament ve 3 boyutlu baskı çalışmalarından önce fizikokimyasal özelliklerin tahmin edilmesinde kullanılan farklı matematiksel modeller geliştirilmiştir. Bu amaçla yapay zekâ (AI, artificial intelligence) teknikleri ile geliştirilen bir internet yazılımı olan “M3DISEEN” isimli yazılım yardımıyla farklı polimerler ve erime derecelerine sahip etkin madde karışımlarından elde edilebilecek FDM yöntemiyle üretilen filamentlerin sahip olabileceği mekanik özellikler ve 3D baskıya uygun olup olmamaları tahmin edilmektedir. Yazılım veri tabanının oluşturulmasında 614 farklı formülasyon ve 145 farklı yardımcı madde ile çalışmalar yapılmıştır. Geliştirilen AI modelin üretim parametrelerini tahmin doğruluğu %70, proses sıcaklık tahmini $\pm 8^{\circ}\text{C}$ aralığındadır. Geliştirilmiş olan bu yazılım ile formülasyon geliştirme çalışmalarının hızlandırılması hedeflenmektedir (Elbadawi ve diğerleri, 2020).

2.9. Farmasötik eklemeli üretim çalışmalarında tasarımla kalite (QbD) yaklaşımı

Tasarımla kalite (QbD), ürün proses gelişiminin ve kontrolünün önceden belirlenmiş hedefler içinde bilimsel risk analizi yöntemleriyle değerlendirildiği sistematik bir yaklaşımdır (Aksu, 2019; Yerlikaya, 2013). QbD prensiplerine göre ürün gelişiminde istatistiksel deney tasarımı, risk analizi, çoklu değişken analizleri gibi matematiksel modelleme araçları ve proses analiz teknolojileri (PAT) kullanılmaktadır (EMA, 2017) (EMA, 2015a).

Son yıllarda tasarımla kalite (QbD) araçları farmasötik eklemeli üretim gelişimi çalışmalarında da kullanılmaya başlanmıştır. Bu kapsamda literatürde istatistiksel deney tasarımı ile eklemeli üretim yönteminde formülasyon gelişimi çalışmaları olduğu gibi (Ma

ve diğerleri, 2015), bu sistemler için geliştirilmiş proses analitik teknolojileri (PAT) cihazlarından da bahsedilmektedir (Cerniglia, Scafidi, Pantano ve Rudlin, 2015) (Vakili ve diğerleri, 2015).

Bu yaklaşımda ürün kalitesi bitmiş üründen tespit edilemez, tasarım ile sağlanabilir. Amacı farmasötik endüstride sıfır hataya ulaşmak, kalite sistemlerini iyileştirmek ve kalite kaynaklı kayıpları azalmaktır. Uygulama esaslarını tanımlayan kılavuzlar aşağıdaki gibidir:

- ICH Q8 (2004) :Farmasötik gelişim (*Pharmaceutical development*) (EMA, 2017)
- ICH Q9 (2006) :Kalite risk yönetimi (*Quality risk management*) (EMA, 2015a)
- ICH Q10 (2007) :Farmasötik kalite sistemi (*Pharmaceutical quality system*) (EMA, 2015b)
- ICH Q11 (2011) :Etkin madde gelişimi ve üretimi (kimyasal ve biyoteknolojik etkin maddeler (*Development and manufacture of drug substances (chemical entities and biotechnological/ biological entities)*)) (EMA, 2012a)
- ICH Q12 (2017) :Farmasötik ürün yaşam döngüsü yönetiminde teknik ve otorite görüşü (*Technical and regulatory considerations for pharmaceutical product lifecycle management*) (EMA, 2020a)

Farmasötik endüstride ürün gelişimi ve üretimi aşamalarında kullanılan QbD kavramı, farmasötik çalışmaların ayrılmaz bir parçası olan analitik yöntem gelişimi ve validasyonu çalışmalarında da “Analitik QbD (AQbD)” adı ile kullanılmaya başlanmıştır. Bu yeni kavram ICH çalışma gruplarında da gündeme getirilmiş olup yeni kılavuzun ICH Q14 adı ile 2021’de yayımlanması beklenmektedir (EMA, 2018). AQbD analitik ölçüm gerekliliklerinden (örn. verinin kullanım amacı) başlayıp geliştirme basamaklarını, analitik metot validasyonunu, endüstriyel uygulamalarını ve ürün yaşam döngüsü sonuna kadarki değişiklik kontrollerini de kapsayan, bilimsel ve risk analizi temelli bir yaklaşıma dayalı olarak incelenmesidir. Bu sayede analiz yöntemi hakkında daha fazla bilgi sahibi olunabilmekte, oluşturulan istatistiksel tasarım sahaları ile (MODR, method operable design region) yöntem parametreleri esnek hale getirilebilmekte ve analitik metotlara bağlı varyasyonlar azalabilmektedir (Bhutani, Kurmi ve Singh, 2014) (Peraman, Bhadraya ve Reddy, 2015). Geliştirilen analitik MODR içerisinde analitik metotun kalite gerekliliklerini (ATP, Analytical target profile) karşılayabilecek yöntem değişiklikleri regülasyon tarafından değişiklik olarak değerlendirilmemektedir.

2.9.1. Kalite hedefli ürün profili (QTPP)

QTPP (*quality target product profile*), ürün kalite karakteristiklerinin bir özeti niteliğinde olup bitmiş ürünün istenen *güvenlik* ve *etkinlikte* olmasını sağlayacak kalite karakteristiklerdir (EMA, 2017). QTPP örnekleri aşağıdaki gibi olabilmektedir.

- *Güvenlik*: Safsızlıklar, degradasyon ürünleri, sterilite, endotoksin, vb.
- *Etkinlik*: Potens, çözünme, farmakokinetik, klinik performans, vb.
- *Kalite*: Uygulama yolu, ilaç şekli, dozajı, kap/kapak geçirgenliği, bitmiş ürün fiziksel özellikleri, vb.

2.9.2. Kritik kalite özelliği (CQA)

CQA (*critical quality attribute*), hedeflenen ürün kalite profiline ulaşmak için bitmiş ürün, etkin madde veya yardımcı maddelerin sahip olması gereken fiziksel, kimyasal, biyolojik veya mikrobiyolojik özellikleri tanımlar (örn. API miktar tayini, film tablet sertliği, bitmiş ürün çözünmesi, vb.) (EMA, 2017).

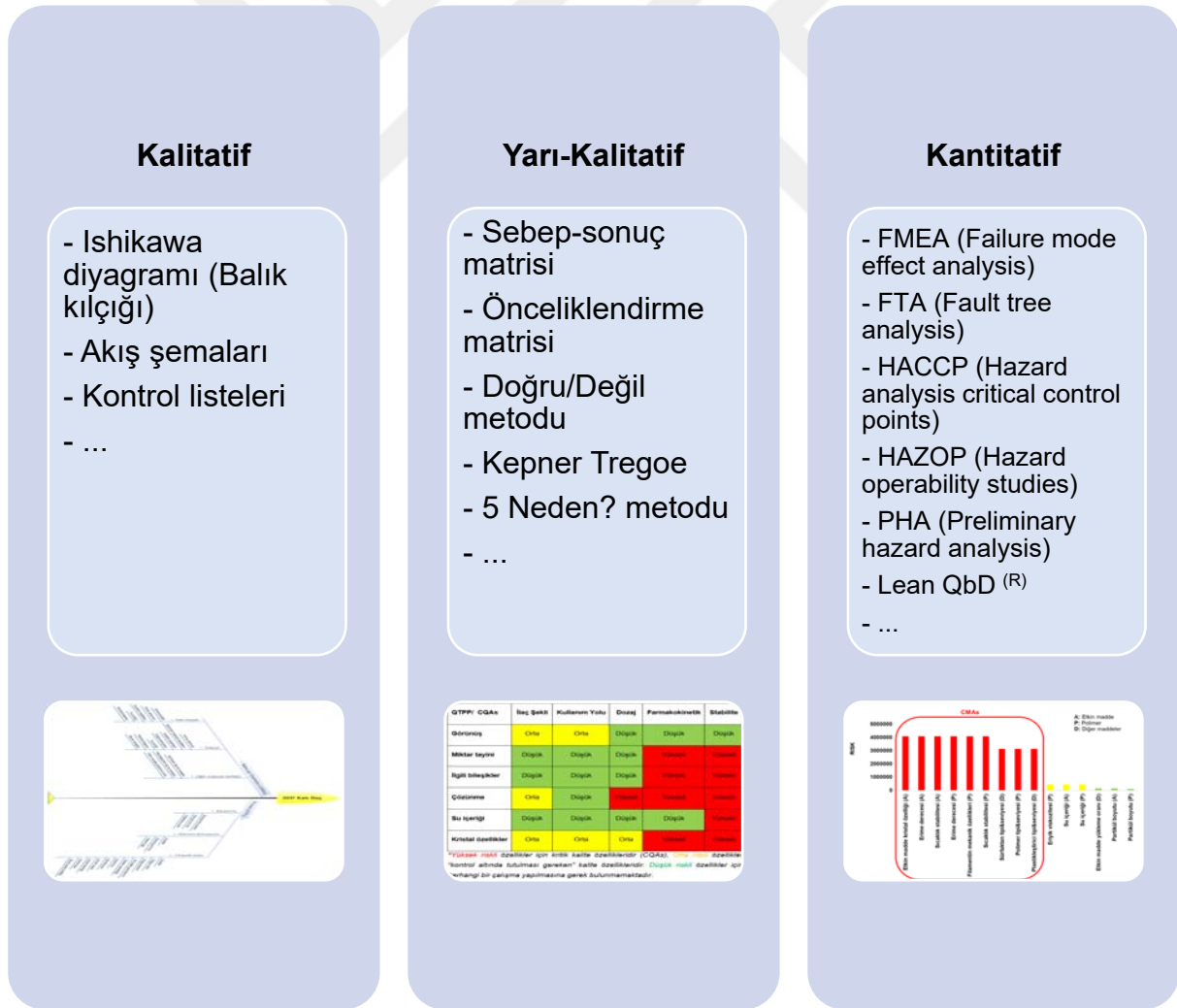
2.9.3. Risk değerlendirme (RA)

Risk, zarar görme olasılığı ile bu zararın şiddetinin kombinasyonudur. Kalite risk yönetimi, yaşam döngüsü boyunca kaliteye dair risklerin değerlendirilmesine, kontrolüne, iletişimine ve gözden geçirilmesine ve revizyonuna yönelik sistematik bir prosestir (EMA, 2015a). Genellikle “Risk = Ciddiyet x Zarar x Saptanabilirlik x Olasılık” formülü ile tanımlanmaktadır.

- *Ciddiyet*: Farmasötik bir ürünün güvenilirlik, etkinlik ve kalitesi açısından söz konusu CQA üzerindeki etkisinin büyüklüğüdür.
- *Zarar*: Ürün kalitesi ya da uygunluğunun kaybindan dolayı ortaya çıkan hasarları ifade eder.
- *Saptanabilirlik*: Herhangi bir tehlikenin varlığının ya da oluşumunun belirlenebilme derecesidir. Yanlış bir durumun ya da olayın saptanabilmesi, tehlikenin kalite üzerindeki etki olasılığını azaltır.

- *Olasılık*: Proses parametresi ya da bir kalite özelliğinin, üretilen ürünün güvenlik, etkinlik ya da kalitesi üzerine etki etme ihtimalidir.

Risk hiçbir zaman sıfır olamaz fakat etkisi azaltılabilir, sıklığı azaltılabilir veya risk kabul edilebilir (EMA, 2015a). Ürün yaşam döngüsü boyunca uygun risk analizi yöntemleri ile CQA üzerinde etkisi olabilecek Kritik materyal özellikleri (Critical material attribute, CMA) ve Kritik proses parametrelerinin (Critical process parameter, CPP), CQAs ve birbiri ile ilişkilerinin risk değerlendirmesi ile tespit edilmesi ve kontrol altında tutulması çok önemlidir. ICH Q9 kılavuzunda herhangi bir yöntem zorunlu tutulmamış olup riskin tanımlanması için kalitatif ya da yarı-kalitatif yöntemlerden, riskin detaylı değerlendirilmesi için kantitatif yöntemlerden faydalanılmaktadır. Farmasötik endüstride sıklıkla kullanılan yöntemler Şekil 2.24'deki gibidir.



Şekil 2.24. Farmasötik endüstride sıklıkla kullanılan risk analizi yöntemleri

Kritik materyal özellikleri (CMA) ve kritik proses parametreleri (CPP)

Kritiklik, bir üretim prosesinde hangi değişkenlerin önemli olduğunu ve bu değişkenlerdeki değişim seviyesinin ne dereceye kadar ürünün kalitesine etki edebileceğini saptayabilmede önemlidir. Kritik materyal özelliği (CMA) veya kritik proses parametresi (CPP), bitmiş ürüne ait etkinlik, kalite ve güvenilirlik özellikleri üzerinde (CQA) “yüksek etkili” olan özelliklerdir. CMA ve CPP’ler çeşitli risk analizi yöntemleri ile belirlenmektedir.

Farmasötik eklemeli üretim (FDM-3DP) geliştirme çalışmalarında literatürde tespit edilen CMA ve CPP’ler sırasıyla Çizelge 2.16 ve Çizelge 2.17’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.16. Farmasötik eklemeli üretim (FDM-3DP) geliştirme çalışmalarında literatürde tespit edilen CMA’lar

Hammaddeler	CMA	Açıklama	Referans
Etkin Madde	Etkin maddenin kristalin özelliği	Etkin maddenin amorf ya da polimorfik yapıda olması, etkin maddenin stabilitesi, çözünürlüğü ve biyoyararlanımı üzerinde etkilidir. FDM yöntemi yüksek sıcaklık içeren bir yöntem olduğu için polimorfik incelemenin yapılması önemlidir.	(Ligon, Liska, Stampfl, Gurr ve Mülhaupt, 2017)
	Sıcaklık stabilitesi	FDM yöntemi yüksek sıcaklık içeren bir yöntem olduğu için etkin madde degradasyonunun incelenmesi önemlidir.	(Okwuosa ve diğerleri, 2016) (Alhnan ve diğerleri, 2016)
	Termoplastik özellikleri	Düşük termoplastik özelliklere sahip etkin maddeler, filamente ilaç yükleme kapasitesini düşürmektedir.	(Pietrzak ve diğerleri, 2015) (Elbadawi ve diğerleri, 2020)
	Molekül ağırlığı	Polimerlerle karışabilen düşük molekül ağırlıklı etkin maddeler, polimer zincirleri arasına girerek plastikleştirici etki gösterebilmektedir.	(Aho ve diğerleri, 2015)
	Partikül boyutu ve şekli	Etkin maddenin çözünmediği sistemlerde eriyik akışkanlığını çözünmeyen partiküler etkilemekte, bu noktada da etkin maddenin partikül boyutu ve şekli önem kazanmaktadır.	(Aho ve diğerleri, 2015) (Khan, 2016)
	Su içeriği	Su içeriği polimerlerde plastikleştirici etkisi gösterip erime ve Tg sıcaklığını düşürebilmektedir.	(Norman ve diğerleri, 2017) (Khan, 2016)

Çizelge 2.16. (devam) Farmasötik eklemeli üretim (FDM-3DP) geliştirme çalışmalarında literatürde tespit edilen CMA'lar

Hammaddeler	CMA	Açıklama	Referans
Etkin Madde	Erime derecesi ve Tg	Filament oluşturulması için yapılan katı dispersiyonunun yapısının belirlenmesinde önemlidir.	(Vo ve diğerleri, 2013)
Polimer	Eriyik viskozitesi	Polimerlerin genellikle yüksek sıcaklıkta zincirlerinde meydana gelen mobilite artışı nedeniyle viskoziteleri düşmektedir. Ekstrüzyon ve 3D baskı esnasında homojen akış için viskozite önemlidir. Yüksek selüloz asetat varlığında viskozite yükselir. Yüksek viskozite printerda tıkanmaya neden olabilir.	(Pietrzak ve diğerleri, 2015) (Aho ve diğerleri, 2015; Maulvi ve diğerleri, 2017) (Khaled ve diğerleri, 2015)
	Eriyik akışkanlığı	Printerın tıkanmaması için akışkanlığın tekdüze olması önemlidir. Akışkanlığı iyi olmayan PVP gibi polimerler ile, termostabil bir dolgu maddesi olan Talk kullanılmadan filament elde edilememektedir.	(Khaled ve diğerleri, 2015) (Okwuosa ve diğerleri, 2016)
	Sıcaklık stabilitesi	Yüksek sıcaklıklarda meydana gelebilecek degradasyon önemlidir (örn. PVP >400°C, TEC >200°C).	(Okwuosa ve diğerleri, 2016) (Alhnan ve diğerleri, 2016)
	Moleküler yapı ve molekül ağırlığı	Uzun zincirli ve yüksek molekül ağırlığına sahip polimerler daha elastik özellikte olmaktadır. Yüksek elastik yapıdaki polimerlerde relaksasyon süresi daha uzun olmakta ve filament şişmesi (<i>die swell</i>) daha fazla görülmektedir.	(Elbadawi ve diğerleri, 2020) (Aho ve diğerleri, 2015)
	Partikül boyutu	Polimerlerin partikül boyutu düşükçe, erime derecesi değil fakat erimesi için geçen süre kısalmaktadır.	(Goyanes ve diğerleri, 2015b)
	Su içeriği	Su içeriği polimerlerde plastikleştirici etkisi gösterip erime ve Tg sıcaklığını düşürebilmektedir.	(Norman ve diğerleri, 2017) (Khan, 2016) (Goyanes ve diğerleri, 2015b)
	Erime derecesi ve Tg	Filament oluşturulması için yapılan katı dispersiyonunun yapısının belirlenmesinde önemlidir.	(Vo ve diğerleri, 2013)
Diğerleri	Plastikleştiriciler	Düşük molekül ağırlıklı plastikleştiriciler, polimer zincirleri arasına daha iyi girerek erime derecesi ve Tg sıcaklığını düşürmektedir.	(Buanz ve diğerleri, 2015)
	Lubrikantlar	Bazı karışımların ekstrüzyon ve baskısı için gerekli olabilmektedir.	(Okwuosa ve diğerleri, 2016)
	Dolgu maddesi	Yüksek miktarda kullanımı, çok yüksek eriyik viskozitesine sahip karışımlar meydana getirebilmektedir.	(Aho ve diğerleri, 2015)
	Por oluşturucular	Por oluşturucu ajanlar ile (örn. D-mannitol) yüksek porlara sahip ve hızlı çözünen sistemler hazırlanabilmektedir.	(Khaled ve diğerleri, 2015)

Çizelge 2.17. Farmasötik eklemeli üretim (FDM-3DP) geliştirme çalışmalarında literatürde tespit edilen CPP'ler

Üretim Basamağı	CPP	Açıklama	Referans
Ön karıştırma	Karıştırıcı geometrisi	Homojen bitmiş ürün elde edilmesi için önemlidir.	-
	Karıştırıcı doluluk oranı		
	Karıştırma süresi ve hızı		
	Üretim ortamına ait sıcaklık ve nem değerleri	Ortam nemi higroskopik hammaddelerin termoplastik yapılarını etkilemektedir.	(Simoes ve diğerleri, 2019) (Khan, 2016)
Filament Ekstrüzyonu	Ekstrüzyon sıcaklığı	Hem kimyasal stabilite, hem de eriyik viskozitesinin ekstrüzyona uygunluğu için önemlidir. Yüksek sıcaklıklarda eriyik viskozitesi çok fazla düşebilmekte, bu da ekstrüderden filamentin sıvı şekilde akmasına ve filament elde edilememesine neden olabilmektedir.	(Elbadawi ve diğerleri, 2020) (Aho ve diğerleri, 2015)
	Ekstrüzyon hızı	Yüksek hızlarda eriyik viskozitesi çok fazla düşebilmekte, bu durum ekstrüderden uygun şekilde filament elde edilememesine neden olmaktadır. Bununla birlikte hızlı ekstrüzyon, filamentin şişmesini (<i>die swell</i>) azaltabilmektedir.	(Simoes ve diğerleri, 2019) (Aho ve diğerleri, 2015) (Goyanes ve diğerleri, 2018)
	Ekstrüder vida tasarımı (tek, çift vida)	Ekstrüderin tek vida ya da çift vidalı olması, eriyik içerik homojenitesi açısından önemlidir.	(Simoes ve diğerleri, 2019) (Aho ve diğerleri, 2015)
	Ekstrüder basıncı	Yüksek basınç eriyik akışında düzensizliklere neden olabilmekte, bu da filamentte homojen olmayan yapılara (camsı, pütürlü) neden olabilmektedir. İlaveten yüksek basınç eriyiğin vidalara yapışmasına da neden olabilmektedir.	(Aho ve diğerleri, 2015) (Khan, 2016) (Khaled ve diğerleri, 2015)
	Ekstrüder uç çapı	3D printer için uygun kalınlıkta filament eldesinde önemlidir.	(Goyanes ve diğerleri, 2018) (Aho ve diğerleri, 2015)
	Filament çapı	Uygun olmayan filament çapı, printerda tıkanmaya sebep olarak baskı alınmasını engelleyebilmektedir.	(Gioumouxouzis ve diğerleri, 2017)

Çizelge 2.17. (devam) Farmasötik eklemeli üretim (FDM-3DP) geliştirme çalışmalarında literatürde tespit edilen CPP'ler

Üretim Basamağı	CPP	Açıklama	Referans
3DP	3DP Baskı sıcaklığı	Optimum sıcaklık, sabit baskı kalitesinde önemlidir. Yüksek sıcaklıklarda tabakalar birbirine kaynaşabilmekte, düşük sıcaklıkta ise tabakalar dayanıklı şekilde yapışamamaktadır.	(Skowrya ve diğerleri, 2015)
	3DP Baskı ucu sıcaklığı		(Skowrya ve diğerleri, 2015)
	3DP Tabla sıcaklığı		(Skowrya ve diğerleri, 2015) (Tyson, Hilton ve Andreae, 2015)
	3DP Baskı Hızı	Uygun baskı görünümünde ve mekanik dayanıklılığında etkilidir.	(Khan, 2016) (Skowrya ve diğerleri, 2015) (Khaled ve diğerleri, 2015) (Goyanes ve diğerleri, 2018)
	3DP Tabla yapısı	Tabla yapısının bitmiş ürünün baskı esnasında yapışabilir özellikte olması gereklidir. Bu amaçla zemin adezyonunu iyileştirmek için kapton bantı ya da Scotch Blue bantları kullanılabilir.	(Skowrya ve diğerleri, 2015)
	3DP Geometrik tasarımı	Hasta uyuncu ve bitmiş üründen etkin madde salımında etkilidir.	(Goyanes ve diğerleri, 2017b) (Goyanes ve diğerleri, 2015c)
	3DP Rezolüsyon	Uygun baskı görünümünde ve mekanik dayanıklılığında etkilidir.	(Pietrzak ve diğerleri, 2015) (Goyanes ve diğerleri, 2018)
	3DP Tasarımı iç dolgu oranı	Uygun baskı görünümünde ve mekanik dayanıklılığında etkilidir. İlaveten bitmiş üründen etkin madde salımında da etkilidir. Örneğin hızlı salım, düşük iç dolgu oranı ve kovan sayısı ile sağlanabilmektedir.	(Tyson ve diğerleri, 2015) (Goyanes ve diğerleri, 2017a)
	3DP Tasarımı iç dolgu paterni		(Khaled ve diğerleri, 2015) (Norman ve diğerleri, 2017)
	3DP Tasarımı kabuk kalınlığı		(Sadıa ve diğerleri, 2018) (Hipolite, 2015)
	3DP Tasarımı kabuk sayısı		(Sadıa ve diğerleri, 2018) (Hipolite, 2015)
	3DP Tasarımı tabaka yüksekliği		(Skowrya ve diğerleri, 2015) (Khaled ve diğerleri, 2015)

2.9.4. Tasarım alanı (DSp) ve istatistiksel deney tasarımı (DoE)

Tasarım alanı (design space, DSp) ICH Q8 kılavuzunda tasarım alanı “ürün kalitesi üzerinde etkili tüm varyasyon kaynaklarının etkilerinin ve etkileşimlerinin çok boyutlu ve matematiksel olarak incelendiği deneysel alan” olarak tanımlanmaktadır (EMA, 2017). Bu deneysel alan:

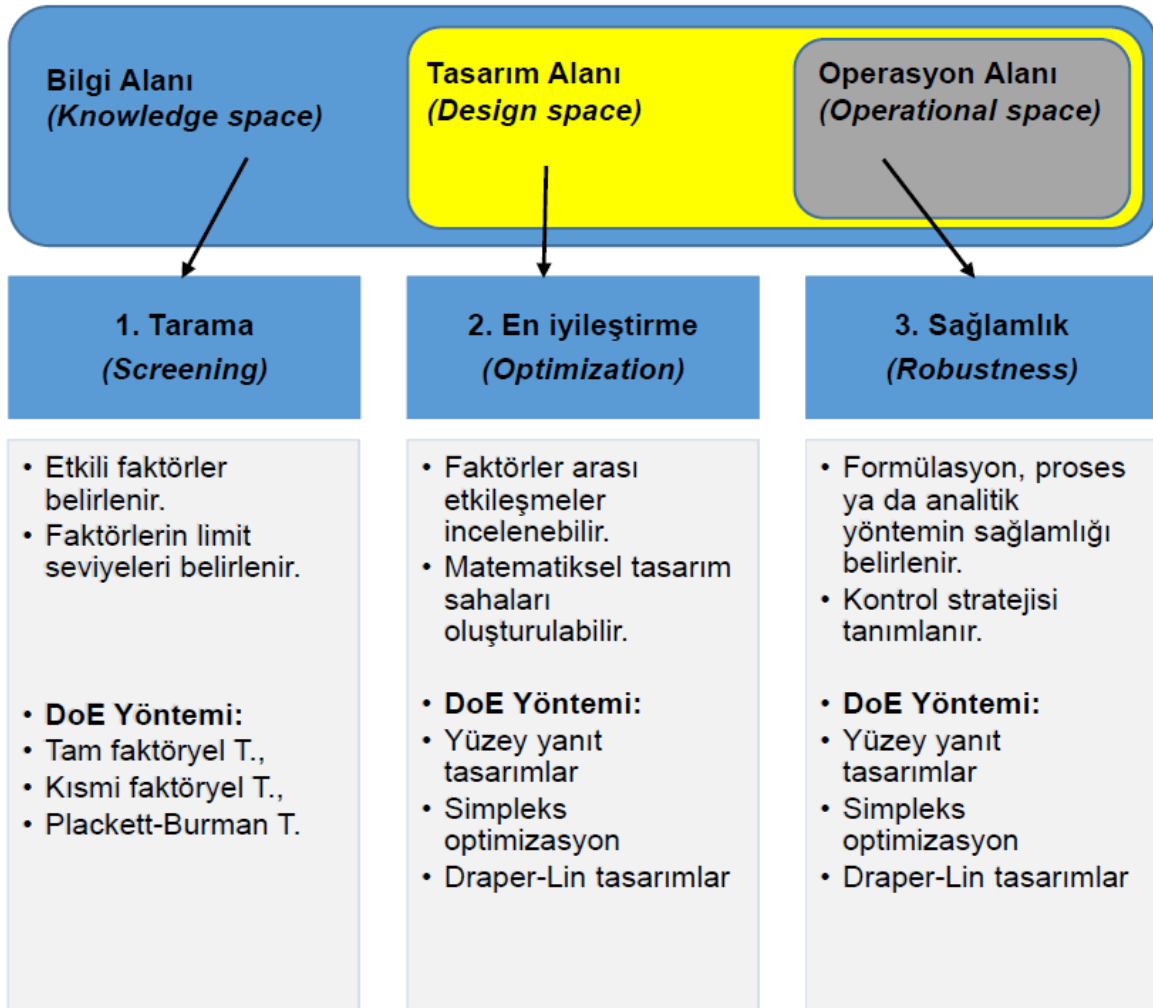
- Birinci dereceden denklemler ile (regresyon, stabilite kinetikleri, vb.)
- İstatistiksel deney tasarımlarıyla (DoE)

- Ölçek büyütme korelasyonlarıyla
- veya yukarıdaki yaklaşımların kombinasyonları ile oluşturulabilmektedir.

DoE çalışmaları üç yapı taşından meydana gelmektedir:

- Cevap (Bağımlı değişken): Ölçülebilen sonuçtur (örn. Çözünme miktarı, analitik metotların sistem uygunluk parametreleri)
- Faktör (Bağımsız değişken): Cevap üzerinde etkisi olabilecek herhangi bir değişkendir (örn. yardımcı madde oranı, mobil faz pH'ı)
- Model: Formülasyon, proses ya da analitik yöntemin matematiksel ifadesidir.

Farmasötik endüstride kullanım alanlarına göre DoE çeşitleri Şekil 2.25'te özetlenmiştir.



Şekil 2.25. Farmasötik endüstride kullanım alanlarına göre DoE

Literatürde HME yöntem gelişiminde kullanılan DoE çalışmaları Çizelge 2.18’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.18. HME yöntem gelişiminde kullanılan DoE çalışmaları

Amaç	Faktörler	Cevaplar	DoE Yöntemi	Referans
Efavirenz için formülasyon ve proses optimizasyonu	Soluplus® oranı Kollidon® VA64 oranı Ekst. hızı Ekst. sıcaklığı	Çözünürlük Çözünme	Box-Behnken	(Pawar ve diğerleri, 2018)
Klortrimazol için proses optimizasyonu	Besleme hızı Ekst. hızı Ekst. sıcaklığı	Tekrar disperse olabılme indeksi Nem içeriği Proses verimliliği	Box-Behnken	(Gajera, Shah ve Dave, 2018)
Itrakonazol için formülasyon optimizasyonu	Plasdone® oranı Klucel® ELF oranı Soluplus® oranı	Tat Çözünme	Simpleks sentroit	(Malaquias ve diğerleri, 2018)
Meloksikam için proses optimizasyonu	Besleme hızı Ekst. hızı Ekst. sıcaklığı	Küresellik Sertlik	Box-Behnken	(Alshetaili ve diğerleri, 2016)
Ziprasidone için fomülasyon optimizasyonu	Kopovidon oranı HPC oranı	Dağılma süresi Çözünme İmpürite	3 ² Merkezi birleşik tasarım	(Banerjee, Shankar ve Prasad, 2015)
HME katı dispersiyonu için proses optimizasyonu	Ekst. yükleme oranı Ekstrüzyon hızı	Spesifik mekanik enerji Ekst. Basıncı & RSD	Merkezi birleşik tasarım	(Probst, Möltgen, Kessler ve Kessler, 2016)
HME katı dispersiyonu için hızlı salımlı formülasyon optimizasyonu	Polimer tipi ve oranı Dağıtıcı tipi ve oranı Seyreltici tipi	Dağılma süresi Çözünme Mekanik dayanıklılık Basılabilirlik	Karışım tasarımı	(Agrawal ve diğerleri, 2016)
İbuprofen için hızlı salımlı formülasyon ve proses optimizasyonu	API yükleme oranı Ekst. hızı Ekst. sıcaklığı Besleme hızı Ön karıştırma Diğer yardımcı madde oranı Eudragit EPO oranı	Ekstrüzyon basıncı Camsı geçiş sıcaklığı Miktar tayini Çözünme Faz geçiş	Plackett-Burman ve Merkezi birleşik tasarım	(Patwardhan, Asgarzadeh, Dassinger, Albers ve Repka, 2015)
Parasetamol için uzatılmış salımlı proses optimizasyonu	API yükleme oranı Ekstrüzyon hızı Ekst. sıcaklığı	Çözünme Partikül boyutu	3 faktörlü fraksiyonel faktöryel tasarım	(Islam, Maniruzzaman, Halsey, Chowdhry ve Douroumis, 2014)
Itrakonazol için hızlandırılmış salımlı formülasyon ve proses optimizasyonu	Bikarbonat oranı Poloksamer oranı Soluplus® oranı Ekst. hızı Ekst. sıcaklığı	Çözünme Termoformabilite	Karışım tasarımı	(Thiry ve diğerleri, 2016)

2.9.5. Kontrol stratejisi

Risk analizi ve Deneysel tasarımlarla aydınlatılmış prosesin sistematik bir şekilde kontrol altında tutulmasıdır. ICH Q10 tanımına göre kontrol stratejisi farmasötik gelişim çalışmalarından elde edilen bilgi birikimiyle proses performansını ve ürün kalitesini güvence altına alacak tüm kontrolleri kapsamaktadır. Kontroller CQA üzerinde etkili olabilecek tüm CMA ve CPP'lerin monitorizasyonunu, üretim koşullarının kontrolünü, in-proses kontrolleri, bitmiş ürün spesifikasyon testleri ve bu testlerin frekansının kontrolü olabilmektedir (EMA, 2015b). FDM-3DP üretim yöntemi için oluşturulabilecek kontrol stratejisi Çizelge 2.19'da sunulmuştur.

Çizelge 2.19. FDM-3DP üretim yöntemi için kontrol stratejisi

CQA	CMA Kontrolleri	CPP Kontrolleri
Güvenlik		
Polimorfik form değişimi	XRD	Proses sıcaklık monitorizasyonu (Khaled ve diğerleri, 2015)
Etkin madde degradasyonu	Hammadde salıverme testleri	Proses sıcaklık monitorizasyonu (Khaled ve diğerleri, 2015)
Etkinlik		
Tanımlama	Hammadde salıverme testleri	Spektroskopik PAT teknikleri (Khaled ve diğerleri, 2015) (Khan, 2016)
Miktar tayini	-	
İçerik tekdüzeliği		
Çözünme		
Kalite		
Görünüş	- Görsel kontrol (Khan, 2016) (Khaled ve diğerleri, 2015) - Eriyik viskozitesi (Boetker ve diğerleri, 2016) (Khaled ve diğerleri, 2015) - Erime derecesi ve Tg - Partikül şekli ve boyut dağılımı (Khaled ve diğerleri, 2015) - Su içeriği (Norman ve diğerleri, 2017)	- PAT teknikleri ile gerçek zamanlı kontroller (Norman ve diğerleri, 2017) - Ekstrüder basınç monitorizasyonu (Khaled ve diğerleri, 2015) (Norman ve diğerleri, 2017) - Proses sıcaklık monitorizasyonu (Khaled ve diğerleri, 2015) - Baskı hızı monitorizasyonu (Norman ve diğerleri, 2017) - Yazılım üzerinden tasarımın kontrolü (Khan, 2016) (Khaled ve diğerleri, 2015)
Mekanik özellikler (Sertlik, friabilite)		
Baskı defektleri		

2.9.6. Ürün yaşam döngüsü yönetimi (PQLI)

Ürün yaşam döngüsü yönetimi (PQLI, Product Quality Lifecycle Implementation), bir ürünün ilk Ar-Ge geliştirme aşamalarından başlayıp son üretim serisinin raf ömrü dolana kadar geçen süre boyunca geçen tüm süreçlerin yönetimidir (EMA, 2017). QbD yaklaşımı ile gündeme gelen “sürekli proses verifikasyonu” kavramı doğrultusunda, ürün kalitesinin yaşam süresi boyunca risk analizi ve bilimsel yaklaşımlarla kontrol altında tutulmasıdır.

2.10. Hücre Kültürü Çalışmaları

İlaçların etkinlikleri ve toksisitelerinin araştırılmasında hücre kültürü çalışmaları, dokulardan enzimatik veya mekanik yöntemlerle izole edilen hücrelerin yapay bir ortamda kontrol altında büyütülmesiyle elde edildiği, fizyolojisi ve biyokimyasal özellikleri standardize edilmiş hücrelerle yapılan çalışmalardır (Antoni, Burckel, Josset ve Noel, 2015). Hücre kültürünün üstünlük ve sakıncaları Çizelge 2.20’de özetlenmiştir (Audus, Bartel, Hidalgo ve Borchardt, 1990).

Çizelge 2.20. Hücre kültürü çalışmalarının üstünlükleri ve sakıncaları

Üstünlükler	Sakıncalar
• Hayvan deneylerinde karşılaşılan yasal ve etik problemlere sebep olmaz. • Canlı ortama göre fizikokimyasal koşullar (pH, sıcaklık, oksijen, vb) daha iyi kontrol edilebilir. • İlaç permeabilitesi ve metabolizması değerlendirilebilir. • İlaç sitotoksitesi değerlendirilebilir.	• Deneyimli personel ve aseptik analiz şartları gerektirir. • Çoğu sürekli hücre hattının stabil olmayan anoploid kromozomal bileşiminden kaynaklanan stabilite problemleri söz konusudur.

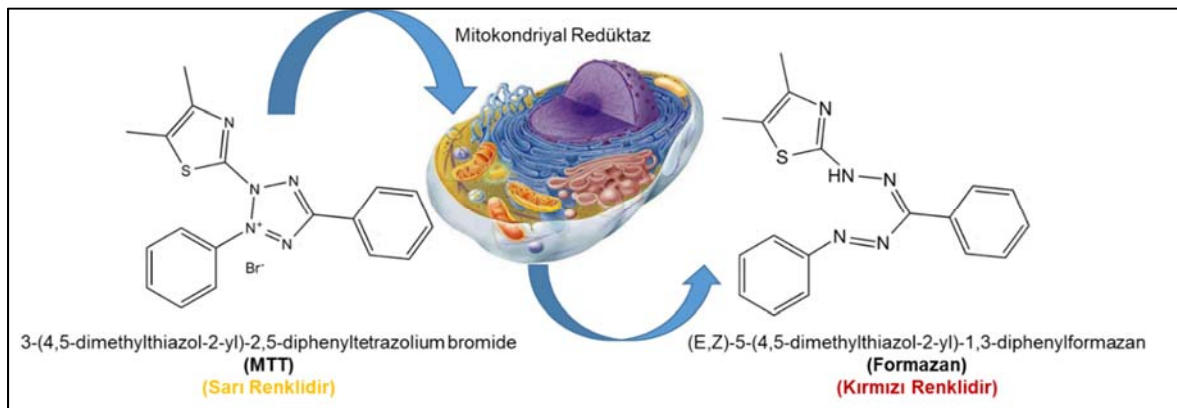
2.10.1. MTT testi ile sitotoksitite

Hücre kültürü çalışmaları, in-vivo çalışmalar yapılmadan önce, deneylerde kullanılması düşünülen maddelerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin incelenmesi için gerçekleştirilen çalışmalardır.

Bu amaçla gelişme fazındaki hücreler, sitotoksik ilaca maruz bırakılır. Hücrelerin ilaca maruz kalacağı süre genellikle maksimum hücre hasarının oluşması için gereken süredir. Bu süre aynı zamanda ilacın stabilitesine de bağlıdır. İlacın uzaklaştırılmasından sonra, hücrelerin 2-3 kez bölünmesi için belli bir süre beklenir. Böylece görünür durumda olup üreyemeyen hücreler ile hem görünen hem de üreyebilen hücreler ayırt edilmiş olur. Yaşayan hücreler, özel boyalar yardımıyla dolaylı olarak teşhis edilir (Yücel, 2015). Sitotoksikite testi sonucunda hücre canlılık oranının % 50'nin üzerinde olması, uygulanan kimyasalın sitotoksik olmadığını ifade etmektedir (Mutlu, Degim, Yılmaz, Essiz ve Nacar, 2011).

Hücre canlılığı ve proliferasyonu deneylerinde sıklıkla kullanılan tetrazolium tuzları MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil- tetrazolium bromit) ve XTT (2,3-bis (2-methyloxy-4-nitro-5-sulfophenyl)5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) olup MTT testi en fazla tercih edilen yöntemdir. Her iki yöntem de hücrelerdeki mitokondriyal dehidrojenaz enzim aktivitesi üzerinden hücre canlılığını ölçmede kullanılmaktadır (Tsukatani ve diğerleri, 2009) (Wang, Cheng, Wang, Wei ve Wang, 2010).

MTT testi kolorimetrik bir yöntemdir. Metod ilk kez 1983 yılında Mosmann tarafından immünolojik çalışmalar için hızlı bir kolorimetrik yöntem olarak kullanılmıştır (Mosmann, 1983) (Ölmez, 2010). MTT testinin esası, sarı renkli çözünbilir özellikteki MTT boyasının, metabolik olarak aktif olan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan ve mitokondriyal enzimlerinden olan “süksinat dehidrojenaz (SDH)” enzimi ile koyu mavi renkli çözünmez özellikteki formazan ürününe dönüşmesidir. Oluşan formazan ürünü çözünür hale getirilir ve oluşan mor renk spektrofotometrik olarak ölçülür. MTT reaksiyonunun kimyasal gösterimi Şekil 2.26'da sunulmuştur.



Şekil 2.26. MTT reaksiyonunun kimyasal gösterimi

Tez çalışmasında MTT testi ile sitotoksosite çalışmaları Hep G2 insan hepatoselüler karsinoma hücre hattı ve Caco-2 insan kolorektal kanser hücre hattı üzerinde gerçekleştirilmiştir.

1. *Hep G2 hücre hattı:* Karaciğer hücre hattının seçiminde, etkin maddenin en ciddi yan etkisinin karaciğer toksisitesi olması dikkate alınmıştır (Bialer ve diğerleri, 2013). Hep G2 hücre hattı, normal karaciğer parankimal hücrelerine benzer sentez ve plazma proteini sekresyonu yapabilmesi nedenleriyle ksenobiotiklerin incelendiği çalışmalarda sıklıkla tercih edilen bir hücre hattıdır (Nowrouzi ve diğerleri, 2010).
2. *Caco-2 hücre hattı:* Oral kullanım için tasarlanan ilaç şekillerinin sitotoksitesinin değerlendirilmesinde L929 hücre hattı ile beraber en çok kullanılan hücre hattıdır (Elsayed, Sharaf-Eldin ve Wadaan, 2015) (Fernandes ve diğerleri, 2012) (Bu, Narayanan, Dalrymple, Cheng ve Serajuddin, 2016). Caco-2 hücre hattının seçilmesinin bir diğer nedeni ise permeabilite çalışmasının yapılacağı Caco-2 hücrelerinin hücre geçiş çalışması esnasında hangi derişimlerde canlı kalabileceğinin görülmesidir.

2.10.2. İntestinal permeabilite ve Caco-2 hücre hattından permeabilite

Gastrointestinal kanaldaki absorpsiyonun çoğunluğu ince bağırsakta gerçekleşmektedir. İntestinal epitel, enterositler, endokrin, ekzokrin, paneth hücreleri, M hücreleri, tuft ve cup hücrelerinin heterojen popülasyonundan oluşmaktadır (Shah, Jogani, Bagchi ve Misra, 2006). Bununla birlikte enterositler en çok görülen hücrelerdir, epitel hücrelerin toplam miktarının % 80-90'ını oluşturmaktadır.

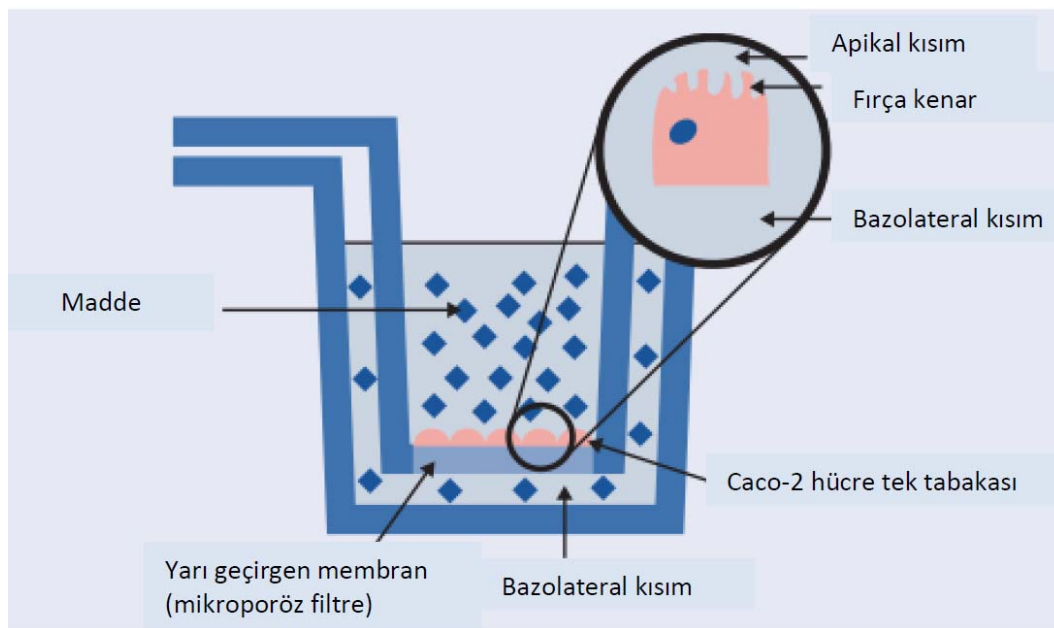
İntestinal epitelden ilaç absorpsiyonu çoğunlukla derişim gradyanı yönünde pasif difüzyonla gerçekleşebilir. Pasif difüzyon, transselüler (enterositlerin hücre membranı yoluyla) veya paraselüler (enterositler arasındaki sıkı kavşaklar yoluyla) yolla gerçekleşir (Shah ve diğerleri, 2006). Çoğu ilaç esas olarak transselüler yolla geçer (Pade ve Stavchansky, 1997). Yağda çözünen maddeler, luminal sıvıdan intestinal epitelin hücre membranlarına hızla dağılabilir ve daha çok transselüler yol ile transport gerçekleşir (Shah ve diğerleri, 2006) (Artursson, Palm ve Luthman, 2001). Paraselüler yolun kapasitesi sınırlıdır. Pasif difüzyon haricinde bazı besin maddeleri, vitaminler ve yapısal analogları intestinal epitelde yer alan spesifik transporter/taşıyıcılar (carrier) ile taşınırlar (Steffansen ve diğerleri, 2004). Makromoleküler ilaçlar vesiküler transport yoluyla transport olur. Düşük transport

kapasitesi ve membran veziküllerinde proteolitik enzimlerin varlığı genel bir ilaç transport yolu olarak bu yolağı kısıtlamaktadır (Shah ve diğerleri, 2006; Swaan, 1998).

Caco-2 (insan kolorektal karsinoma hücresi) hücrelerinden geçiş çalışmaları, oral yolla verilmesi planlanan formülasyonların absorpsiyonlarının incelenmesi için yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir (Shah ve diğerleri, 2006) (Artursson ve diğerleri, 2001) (Yamashita ve diğerleri, 2000).

Caco-2 hücreleri yapısal, morfolojik ve biyokimyasal fonksiyonları bakımından da bağırsak epitelyumuna benzerlik göstermektedir ve intestinal ilaç transport ve metabolizmasının incelenmesinde, etkin madde absorpsiyon çalışmalarında yeni bilgilerin elde edilmesinde, *in-vitro* bir model olarak başarıyla kullanılmaktadır (Mutlu ve diğerleri, 2011). Yapılan literatür çalışmaları Caco-2 permeabilite çalışmaları ile *in-vivo* absorpsiyon çalışmalarının iyi bir korelasyon gösterdiğini ortaya koymuştur (Artursson ve diğerleri, 2001).

Caco-2 hücreleri, insan ince bağırsağında yer alan absorptif hücrelerine benzer şekilde ilaç taşıyıcıları eksprese eder, mikrovilli, interselüler *tight junctions* ve çeşitli enzimler içerir (Seithel, Karlsson, Hilgendorf, Björquist ve Ungell, 2006; Ward, Tippin ve Thakke, 2000). Mikroporöz bir filtrede Caco-2 hücrelerinin kültürü şematik olarak gösterilmiştir (Şekil 2.27)



Şekil 2.27. Mikroporöz bir filtrede Caco-2 hücrelerinin kültürünün şematik gösterimi

Gastrointestinal sistemden sistemik dolaşıma giren maddeler öncelikle intestinal duvar ve karaciğer (ilk geçiş etkisi) bariyerlerini geçmek zorundadır. İnsanlardaki karaciğer ilk geçiş etkisinin de yansıtılabilmesi için insan karaciğerinden elde edilen hepatosit hücre kültürlerinin de kullanılması ile insanlardaki oral biyoyararlanımın tahmin edilmesine daha yakın sonuç verecek hibrid sistemlerin kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (Li ve diğerleri, 2007) (Cheng ve diğerleri, 2006). Li ve ark. çalışmasında farklı etkin maddeler Caco-2/hepatosit hibrid sistem ile incelenmiş ve kabul edilebilir bir korelasyon olduğu bildirilmiştir (Li ve diğerleri, 2007). Yapılan başka bir çalışmada, rastgele seçilen 72 değişik etkin madde sıçanlara in-vivo uygulanarak AUC_{0-6sa} tayin edilmiş ve aynı maddeler Caco-2/sıçan hepatosit hibrid sisteme uygulanarak elde edilen sonuçlar arasında kabul edilebilir bir korelasyon bulunduğu ve hibrid sistemin % 88 doğrulukla tahmin etmeyi sağladığı bildirilmiştir (Cheng ve diğerleri, 2006).

Hücre kültürü çalışması esnasında hücre bütünlüğünün tespiti, çalışma sonucunun doğruluğu için çok önemli olmaktadır. Bu amaçla elektriksel direncin ölçüldüğü “TEER (Transepitel Elektriksel Rezistans)” yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır (Motz, Schaefer, Balbach, Eichinger ve Lehr, 2007). TEER ölçümü volt-ohm metre kullanılarak insertin üst ve alt kısımlarına elektrod yerleştirilerek yapılır (Shah ve diğerleri, 2006). Literatürde > 300Ω değer bulunması, çalışma esnasında hücre bütünlüğünün korunduğunu göstermektedir (van Breemen ve Li, 2005).

Çalışma sonucunda permeabilite katsayısı (Kishore ve diğerleri) Eş.2.1’deki formül ile hesaplanmaktadır.

$$P_{app} = dQ/dt \frac{dQ/dt}{A \times C_0} \quad (2.1)$$

P_{app} : Permeabilite katsayısı (cm/zaman)

dQ/dt : Geçirgenlik hızı

A : Membran alanı

C_0 : Donör kompartmandaki başlangıç ilaç derişimi

Literatürde P_{app} değerlerine göre permeabilite sınıflandırması aşağıdaki şekillerde paylaşılmıştır:

- “Düşük-Yüksek” şeklinde sınıflandırma (van Breemen ve Li, 2005).:
 - o Düşük: Mannitol (Papp: $0,3 \cdot 10^{-6}$ cm/sn):
 - o Yüksek: Propranolol (Papp: $5 \cdot 10^{-5}$ cm/sn)
- “Zayıf-Orta-İyi” şeklinde sınıflandırma (Akdag, Gulsun, İzat, Oner ve Sahin, 2020; Yee, 1997):
 - o Zayıf: 0%–20% (Papp $< 1 \cdot 10^{-6}$ cm/s)
 - o Orta: 20%–70% (Papp $(1-10) \cdot 10^{-6}$ cm/s)
 - o İyi: 70%–100% (Papp $> 10 \cdot 10^{-6}$ cm/s)

2.11. Denge Çözünürlük ve İntrinsik Çözünme

Etkin maddelerin sistemik absorpsiyonu, etkin maddenin emilim bölgesinde ilaç şeklinden çözelti haline geçmiş olmasına bağlıdır. Bu anlamda etkin maddenin çözünürlüğü, biyoyararlanım üzerinde en etkili parametrelerden biridir. Çözünürlük, denge koşulunda bir maddenin bir çözücü içerisinde çözünebileceği maksimum madde miktarı olarak tanımlanmaktadır. Elde edilen çözelti “doymuş çözelti”, bu çözeltideki çözünürlük değeri ise “denge çözünürlük” olarak isimlendirilmektedir.

İntrinsik çözünme hızı (intrinsic dissolution rate, IDR) bir etkin maddenin sabit yüzeyden sabit sıcaklık, karıştırma hızı, pH ve iyonik kuvvetteki bir çözünme ortamına salım hızı olarak tanımlanmaktadır (Viegas, Curatella, Winkle ve Brinker, 2001) . Etkin maddeye ait intrinsik bir özellik olup farklı tuzların ve polimorfların seçiminde kullanılabilmektedir.

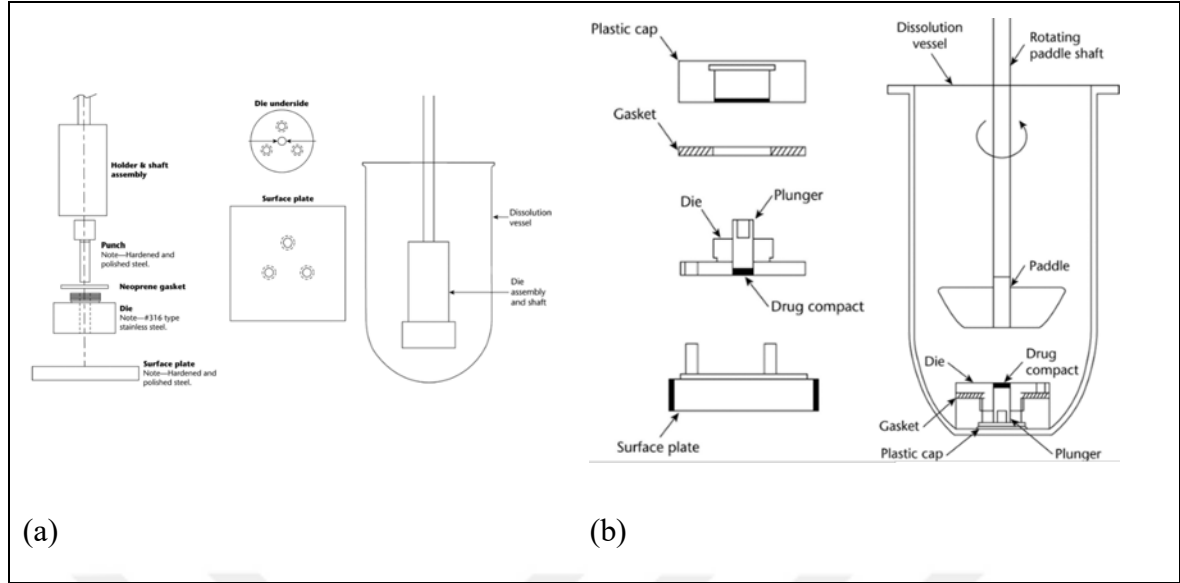
IDR ölçümü ile elde edilen çözünme değeri, klasik denge çözünürlük deneylerine göre daha fazla bilgi içerdiği, daha fazla ayırt edici olduğu ve in-vivo çözünmeyi daha fazla yansıttığı düşünüldüğü için literatür ve otorite tarafından çözünürlük sınıflandırmalarında denge çözünürlük çalışmasının yerine geçebileceği belirtilmektedir (Yu, Carlin, Amidon ve Hussain, 2004) (Dezani ve diğerleri, 2013; Issa ve Ferraz, 2011). Hatta hızlı salımlı ilaç şekilleri için IDR sonuçlarının biyomuafiyette kullanılabileceği tartışılmaktadır (Milani, Jalali, Azimi ve Valizadeh, 2009).

IDR yönteminin denge çözünürlük çalışmalarına göre üstünlükleri aşağıdaki gibidir (Saydam ve Takka, 2020):

- Her iki yöntem de sıcaklık ve çözünme ortamı gibi fizyolojik koşulları taklit etmektedir. Fakat denge çözünürlük çalışmasının uzun sürede tamamlanması (örn. 72 saat) nedeniyle zaman içinde deney sıcaklığında varyasyonlar olabilmekte, çözünme ortamı hacmi buharlaşarak azalabilmektedir. IDR’de ise deneyler daha standardize sistemlerde gerçekleştirilmekte olup deney koşullarında varyasyon meydana gelmemektedir.
- Test periyodunun uzun olması, sıcaklığa hassas etkin maddeler için de sakıncalıdır.
- Denge çözünürlük çalışmaları her hangi bir standardı olmayan çalkalayıcı bir karıştırıcının bulunduğu su banyosunda balon jojeler içerisinde gerçekleştirilmekte iken IDR çalışmaları standart USP çözünme aparatında gerçekleştirilmektedir. Bu sayede tekrarlanabilir ölçümler alınabilmektedir (Etherson ve diğerleri, 2020).
- İlaveten denge çözünürlük çalışmasında kullanılması gereken etkin madde miktarı genellikle çok yüksek iken (örn. 2000 mg), IDR’de bu miktar çok daha düşüktür (örn. 200 mg). Bu durum özellikle az miktarda bulunan ve pahalı etkin maddeler için önemlidir.

Etkin maddenin sabit yüzey alanından salınmasının önemi ilk defa 1897 yılında Noyes-Whitney tarafından gündeme getirilmiş olup ölçüm yapılan ve günümüzde dönen disk (*rotating disk*) adı ile anılan “wood aparatı”, 1965 yılında John Wood tarafından geliştirilmiştir (Wood, Syarto ve Letterman, 1965). Konuyla ilgili zaman içinde pek çok çalışma gerçekleştirilmiş olup 2013 yılında Amerikan farmakopesinde yayımlanan “USP <1087> Apparent intrinsic dissolution-Dissolution testing procedures for rotating disk and stationary disk” (USP, 2021a)” monografı ile analiz yöntemi standardize edilmiştir. Monografıta iki tip IDR yöntemi tanımlanmıştır.

USP <1087> de tanımlanan IDR sistemlerine ait resimler Şekil 2.28’de sunulmuştur. Her iki yöntem de standart çözünme cihazlarında çalışabilir. İki yöntem arasındaki fark çözünme yüzeyindeki sıvı akışı şeklidir. Dönen diskte dönme hızı, durgun sıvıda mührenin kendi dönüşü ile sağlanırken sabit diskte palet yardımı ile sıvı akışı gerçekleşir (USP, 2021a). Dönen diskte numune aşağı doğru dururken sabit diskte duruş yukarıya doğrudur. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda her iki sistem ile elde edilen IDR sonuçlarının birbirine benzer olduğu gösterilmiştir (Viegas ve diğerleri, 2001).



Şekil 2.28. USP <1087> de tanımlanan IDR sistemlerine ait resimler (a) Dönen disk (rotating disk, Wood apparatus), (b) Sabit disk (stationary disk)

Yöntemde IDR değeri incelenmek istenen materyal, baskı yardımıyla çözünmeyen ve sabit yüzey alana sahip bir mühreye yerleştirilir. Materyalin yerleştirildiği sabit yüzeyli mühre, hidrodinamik koşullardan oluşabilecek varyasyonlardan korunmak amacıyla çözünme kuvvetinin belirli bir konuma sabitlenir. Böylelikle materyalin sabit bir yüzey alandan salınabilmesi sağlanır (USP, 2021a). Literatürde farklı analiz parametreleri ile gerçekleştirilmiş çalışmalar bulunmakta olup Çizelge 2.21’de özetlenmiştir. Bununla birlikte IDR sonucu üzerinde en fazla etkili olan parametrelerin dönüş hızı ve sürfaktan içeriği olduğu: baskı kuvveti, çözünme ortamı hacmi ve mühre konumunun etkisiz olduğu literatürde belirtilmiştir (Pinto, Cabral ve Sousa, 2014) (Yu ve diğerleri, 2004).

IDR genellikle birim zamanda salınan madde miktarı şeklinde (örn. mg/dk) ifade edilirken çözünme akısı (flux) birim zamanda birim yüzey alandan salınan madde miktarı şeklinde ifade edilmektedir (örn. (mg/dk)/cm²). Hesaplanması amacıyla zamana karşı kümülatif çözünen madde miktarı grafiğe geçirilir.

Veri noktaları üzerinden lineer regresyon yapılır. Regresyon Eğim değeri (mg/dk) çözünme hızını ifade eder. Akı ise “(mg/dk)/cm²” ile ifade edilir. Eğer grafik lineer değil, pozitif kavisli ise mühre içerisindeki baskı almış tozun kırılması, dökülmesi, delaminasyonu nedeniyle olabilir. Grafik negatif kavisli ise amorf formun kristal forma dönüşümü, anhidrat

formun hidrat form dönüşümü, tuz oluşumu ya da sink koşula uyulmaması söz konusu olabilir.

Elde edilen IDR değeri $<0,1 \text{ mg/dk/cm}^2$ ise, etkin maddenin düşük çözünürlüğe sahip olduğu ifade edilir (Yu ve diğerleri, 2004).

Çizelge 2.21. Literatürde kullanılan IDR analiz parametreleri

Parametre	Değer	Referans
Disk Çapı/ Yüzey Alanı	Çap: 0,2-1,5 cm	(USP, 2021a)
	Çap: 0,8 cm çap /0,5 cm ²	(Viegas ve diğerleri, 2001) (Dezani ve diğerleri, 2013) (Yu ve diğerleri, 2004)
	Çap: 0,6 cm /0,28 cm ²	(Milani ve diğerleri, 2009)
Baskı Süresi/ Kuvveti	1 dk / 15 MPa	(USP, 2021a)
	4-5 dk / 2000psi (13,78 MPa, 1 Psi = 0,00689 MPa)	(Viegas ve diğerleri, 2001) (Yu ve diğerleri, 2004)
	1 dk / 7,84 MPa	(Milani ve diğerleri, 2009)
Çözünme Sıcaklığı	37°C	(USP, 2021a) (Viegas ve diğerleri, 2001)
Çözünme Hacmi	900 mL	(Viegas ve diğerleri, 2001) (Yu ve diğerleri, 2004)
Çözünme Ortamı	Sink koşul, degaze, sulu	(USP, 2021a)
	Çözünürlüğü düşük etkin maddeler için sürfaktan ya da kosolvan içeren ortamlar	(Viegas ve diğerleri, 2001)
Dönme Hızı	60-500 rpm arasında değişmekte olup USP'de 300 rpm tavsiye edilmektedir	(USP, 2021a)
	50 rpm	(Viegas ve diğerleri, 2001) (Dezani ve diğerleri, 2013)
	100 rpm	(Yu ve diğerleri, 2004) (Milani ve diğerleri, 2009)
Aparat-Zemin Mesafesi	1 inç (2,54 cm)	(Viegas ve diğerleri, 2001)
	0,5 inç	(Yu ve diğerleri, 2004)
Numune Alma Noktaları	Minimum 5 nokta olmalıdır.	(USP, 2021a)
	Düşük çözünürlüklü API'lerde 8 saat sürebilir	(Milani ve diğerleri, 2009)



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal İsim	Marka İsmi	Firma, Ülke
Asetonitril	Asetonitril	Merck, Almanya
Caco-2 Hücre hattı	Caco-2 Hücre hattı	ATCC, ABD
Dietilen glikol monoetil eter	Transcutol®	Gattefossé, Fransa
Dimetilaminoetil metakrilat kopolimer	Eudragit® E PO	Evonik, Almanya
Dimetilformamid	Dimetilformamid	Merck, Almanya
Dimetilsülfoksit	Dimetilsülfoksit	Glentham, İngiltere
DMEM 4500 mg/L glukoz L-glutamin sodyum piruvat ve sodyum bikarbonat	DMEM 4500 mg/L glukoz L-glutamin sodyum piruvat ve sodyum bikarbonat	Cegrogen, Almanya
Fetal bovine serum	Fetal bovine serum	Capricorn, Almanya
Fosfat tamponlu salin tabletler	Fosfat tamponlu salin tabletler	Bioshop, Kanada
Hanks' Balanced Salts (HBS), Ca & Mg, w/o Fenol kırmızısı	Hanks' Balanced Salts (HBS), Ca & Mg, w/o Fenol kırmızısı	Capricorn, Almanya
Hidroklorik asit (%37)	Hidroklorik asit (%37)	Merck, Almanya
Hidroksipropil betasiklodekstrin	Kleptose® HPB	Roquette, Fransa
Hidroksipropil metilselüloz	Affinisol® 15 cP	Dow, ABD
Hidroksipropil selüloz	Klucel® EXF	Ashland, ABD
HME Cleaner Plus® GMP	HME Cleaner Plus® GMP	Bioground, Almanya
Lauroil makrogol-32 gliseritleri	Gelucire® 44/14	Gattefossé, Fransa
L-Glutamin (200 mM)	L-Glutamin (200 mM)	Wisent, Kanada
Magnezyum stearat	Magnezyum stearat	Magnesia, Almanya
Mannitol/ Krosopovidon/ Polivinil alkol	Ludiflash®	BASF, Almanya
Mannitol/ Mısır nişastası	Pearlitol® Flash	Roquette, Fransa
Metanol	Metanol	Merck, Almanya
MTT Reajanı	MTT Reajanı	Serva, Almanya
PEG monostearat	Gelucire® 48/16	Gattefossé, Fransa
PEG-32 Hidrojene palm glisteritleri	Acconon® C-50	Abitec, ABD

Çizelge 3.1. (devam) Kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal İsim	Marka İsmi	Firma, Ülke
PEG-40 Hidrojene hint yağı	Kolliphor® RH 40	BASF, Almanya
PEG-400	Kollisol® 400	BASF, Almanya
PEG-4000	Carbowax® 4000	Ineos, İngiltere
PEG-6	Pluriol® E300	BASF, Almanya
PEG-6000 / vinilkaprolaktam / vinil asetat kopolimeri	Soluplus®	BASF, Almanya
PEG-8000	Carbowax® 8000	Dow, ABD
Polioksil hint yağı	Kolliphor® EL	BASF, Almanya
Polisorbat 80	Kolliphor® PS 80	Croda, İngiltere
Polivinil alkol 26-88	Polivinil alkol 26-88	Merck, Almanya
Polivinil alkol/poliyetilen glikol graft kopolimeri	Kollicoat® IR	BASF, Almanya
PVP K-12	Kollidon® 12	BASF, Almanya
PVP K-17	Kollidon® 17	BASF, Almanya
PVP K-30	Kollidon® 30	BASF, Almanya
Poloksamer P188	Kolliphor® P188	BASF, Almanya
Poloksamer P407	Kolliphor® P407	BASF, Almanya
Potasyum dihidrojen fosfat	Potasyum dihidrojen fosfat	Merck, Almanya
Rufinamit (etkin madde)	Rufinamit (etkin madde)	MSN, Hindistan
Rufinamit (referans standart)	Rufinamit (referans standart)	Toronto research chemicals, Kanada
Sodyum lauril sülfat	Sodyum lauril sülfat	Wisent, Kanada
Stearoil polioksil-32 gliseritleri	Gelucire® 50/13	Gattefosse, Fransa
Steril penisilin (10,000 Unite) ve streptomisin (20 mg/mL) çözeltisi	Steril penisilin (10,000 Unite) ve streptomisin (20 mg/mL) çözeltisi	Wisent, Kanada
Triasetin	Kollisol® GTA	BASF, Almanya
Trietil sitrat	Citrofol® AI	Jungbunzlauer, İsviçre
Tripan mavisi çözeltisi (0,4%)	Tripan mavisi çözeltisi (0,4%)	Bioind, İsrail
Tripsin (% 0,25) Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) içerisinde	Tripsin (% 0,25) Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) içerisinde	Capricorn, Almanya
Vinilpirolidon-vinil asetat kopolimeri	Kollidon® VA64	BASF, Almanya
WST-1	WST-1	Abbkine, ABD

3.1.2. Kullanılan alet ve malzemeler

Çizelge 3.2. Kullanılan alet ve malzemeler

Alet ve Malzeme	Firma, Ülke
0,22 µm naylon filtre	Sartorius, Almanya
0,45 µm Hidrofilik PVDF filtre	Merck Millipore millex-HV, Almanya
3D Yazıcı	Craftbot 3, Macaristan
-80°C dondurucu	Thermo Scientific, ABD
96 gözlü plakalar	Sarstedt, Almanya
Analiz kolonu (Nucleosil C18, 5 µm, 125 x 4.6 mm ters faz kolon)	Macherey-Nagel, Almanya
Dağılma	Erweka ZT 722, Almanya
Diferansiyel tarama kalorimetresi	Shimadzu DSC-60, Japonya
Dissolüsyon	Distek Evaluation 6100, ABD
Ekstruder	Filabot EX2, ABD
FTIR spektrometre	Shimadzu Prestige, Japonya
HPLC	Agilent 1260 LC, Almanya
Hücre kültürü flaskları (25cm ² ve 75 cm ²)	Sarstedt, Almanya
İnkübatör	Sanyo, Japonya
Kütle Spektrofotometresi	Agilent 6550 Q-TOF Allions, Almanya
Küme ve sıkıştırılmış dansite ölçümü	Pharma Test PT-DTI, Almanya
Laminar akış	Clean Air, Almanya
Manyetik karıştırıcı	Heidolph MR Hei-Tech, Almanya
Mikro plaka okuyucu	SpectraMax, ABD
Otomatik pipet seti (200µL ve 1 mL)	Eppendorf, Almanya
Otomatik pipet ucu (200µL ve 1 mL)	Tarsons, Hindistan
Partikül büyüklüğü ölçme cihazı	Malvern Mastersizer 2000, İngiltere
pH Metre	Mettler Seven Easy, ABD
Saf su ünitesi	MES13 Super M UP/5600, Minipure®, Türkiye
Santrifüj cihazı	Allegra X-30R, Almanya
Santrifüj tüpü (2mL, 15mL ve 50 mL)	Sarstedt, Almanya
SEM	Quanta 400F Field Emission, ABD
Serolojik pipet (5mL ve 25 mL)	Sarstedt, Almanya
Stabilite kabini	Nüve TK 252, Türkiye
Su tayini (Karl Fischer)	Mettler Toledo V30, ABD

Çizelge 3.2. (devam) Kullanılan alet ve malzemeler

Alet ve Malzeme	Firma, Ülke
Süzme kiti	Alltech, Türkiye
Tablet Baskı	Korsch XL-100PRO, Almanya
Tablet Multicheck	Erweka Multicheck, Almanya
Tensiometre	Tinius Olsen H5KS, Norveç
Terazi (10mg-220g)	Mettler Toledo AB204-S, ABD
Terazi (5 Haneli, 2mg- 120g)	Mettler Toledo XSE105 DualRange, ABD
Ultrasantrifüj	Hitachi CS 150GXL, Japonya
Ultrasonik banyo	Brainsonic 221, Almanya
UPLC-MS	WATERS H-Class, ABD
Vorteks	Nüve-NM 110, Türkiye
XRD	Bruker D8 Advance, ABD

3.2. Yöntem

Tez çalışmalarında rufinamit içeren eklemeli üretim tekniği (fused deposition modelling, FDM) ile 3 boyutlu yazıcıda üretilmiş tablet formülasyonlarının geliştirilmesi, formülasyonların karakterizasyonu, hücre kültürü çalışmaları ve hayvan deneyi çalışmaları yapılmıştır.

3.2.1. Ön formülasyon çalışmaları

Rufinamitin denge çözünürlük tayini

Rufinamitin farklı ortamlardaki denge çözünürlük değeri, USP 43 <1236> *Solubility Measurements*” monografında belirtilen “*Methods for Determination of Equilibrium Solubility*” yöntemine uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle göre etkin maddenin aşırı miktarı (1-2 mg/mL) kapaklı bir flask içine alınmış, üzerine flask hacminin yarısı kadar çözünürlük ortamı ilave edilmiş ve sonikasyon yardımıyla toz partiküllerin yüzey alanı artırılmıştır. Flaskın dibinde çökelti olduğu gözlenmiştir. Test numunesi üç paralel hazırlanmıştır. Hazırlanan test çözeltileri 24 saat boyunca ultrasonik banyo içinde $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta manyetik karıştırıcı ile maksimum hızda karıştırılmış, çözünürlüğün dengeye geldiğinin tespiti amacıyla 6. Saat, 12. Saat ve 24. Saat’te numuneler alınmış, gerekli seyreltmeler yapılmış ve uygun şekilde doyurulmuş filtrelerden filtre edilerek valide

edilen miktar tayini yöntemiyle HPLC ile analiz edilmiştir. İncelenen çözünürlük ortamları aşağıdaki gibidir:

- Saf Su
- Saf Su + %1,0 SLS
- Saf Su + %2,0 SLS
- 0,1 N HCl
- 0,1 N HCl + %2,0 SLS
- pH 4,5 Asetat Tamponu
- pH 4,5 Asetat Tamponu + %2,0 SLS
- pH 6,8 Fosfat Tamponu
- pH 6,8 Fosfat Tamponu + %2,0 SLS

Rufinamitin erime derecesi tayini

Rufinamitin erime derecesi tayini için Gazi üniversitesi eczacılık fakültesi farmasötik teknoloji bölümü laboratuvarında bulunan Shimadzu DSC-60 (Japonya) cihazı ile diferansiyel taramalı kalorimetri (Differential scanning calorimetry, DSC) yöntemi kullanılmıştır. DSC, örnek ve referansın sıcaklıklarının aynı olması için gereken sıcaklık miktarının ölçümüne dayanan termal analiz yöntemidir. Çalışma 10°C/dak tarama hızında 300°C'ye kadar yapılmıştır. Örnekler 2 mg tartılarak alüminyum örnek kaplarına konulmuştur. Bu örnek referans boş hücreye karşı analiz edilmiş ve etkin madde termogramı elde edilmiştir. 25°C - 300°C sıcaklık aralığında, azot atmosferi altında deney gerçekleştirilmiştir.

Rufinamitin kristal modifikasyonunun incelenmesi

Rufinamitin kristal modifikasyonu Gazi Üniversitesi Teknoloji Fakültesi laboratuvarında bulunan Bruker markalı ve D8 Advance modeli X-ışını difraktometresi (X-ray diffractometer, XRD) cihazı kullanılarak 2,0 rotasyon/dk ölçüm hızında 3°-90° 2-Theta arasında incelenmiştir.

Rufinamitin FTIR analizi

Rufinamitin Fourier dönüşümlü kızılötesi (Fourier transform infrared, FTIR) spektrumu Drog-san ilaçları kalite kontrol bölümü laboratuvarında bulunan Shimadzu marka ve Prestige modelli zayıflatılmış toplam yansıma (Attenuated total reflection, ATR) modüllü ATR-FTIR spektrometresi ile alınmış ve dalga sayısı cm^{-1} cinsinden değerlendirilmiştir.

FTIR ile yapılan analizde örnek gönderilen kızılötesi ışığı absorbe eder, farklı dalga boylarında absorbe edilen enerji ölçülerek maddenin moleküler yapısı ve bileşenleri belirlenir. Farklı dalga boyunda elde edilen absorpsiyon bantları her bir madde için eşsizdir ve maddelerin tanınmasında kullanılır.

Rufinamitin partikül büyüklüğü dağılımının ölçülmesi

Etkin maddenin partikül büyüklüğünü ölçmek için Drog-san ilaçları Ar-Ge bölümü laboratuvarında bulunan Malvern marka ve Mastersizer 2000 modelli cihaz kullanılmıştır. Cihaz 0,02-2000 μm arasındaki partikül büyüklüğüne sahip tanecikleri ölçmeye elverişlidir ve çalışma prensibi partikül yüzeyine çarpan lazer ışığının kırılmasının belirlenmesidir. Rufinamitin çözünmediği çözücü olan su içerisinde disperse edilerek ölçümler yapılmıştır (n=3).

Rufinamitin toz akış özelliklerinin belirlenmesi

Etkin maddenin küme dansitesi, sıkıştırılmış dansitesi, basılabilme indeksi ve Hausner oranı, Avrupa Farmakopesi “<2.9.6> Powder flow” monografına uygun olarak gerçekleştirilmiştir (Ph.Eur., 2020).

Rufinamitin kütle spektrumu

Rufinamitin kütle spektrumu, Gazi üniversitesi farmasötik kimya laboratuvarında bulunan 4 kutuplu uçuş zamanlı kütle spektroskopisi (Quadrupole time of flight, QTOF) dedektörlü Agilent marka ve 6550 Q-TOF Allions modelli kütle spektrometresi ile alınmıştır. Bu amaçla 1 mg rufinamit 200 mL asetonitrilde çözündürülmüş, 0,5 μL /dk akış hızında sisteme verilmiştir.

Rufinamitin UV spektrumu

Rufinamitin ACN:MeOH:Su (40:50:10) çözeltisi içindeki ultraviyole (UV) spektrumu, Drogan ilaçları Ar-Ge bölümü laboratuvarında bulunan diyot dizisi dedektörlü (diode array detector, DAD) Agilent marka ve 1260 LC modeli yüksek basınçlı sıvı kromatografi (high pressure liquid chromatography, HPLC) cihazı ile alınmıştır.

3.2.2. Rufinamitin miktar tayini yöntemlerinin geliştirilmesi ve validasyonu

Rufinamitin in-vitro salım çalışmalarında ve stabilite testlerinde kullanılan miktar tayini çalışmaları Agilent marka ve 1260 LC modeli ultraviyole (Ultraviolet, UV) dedektörlü HPLC cihazı ile gerçekleştirilmiştir (Yöntem 1).

Rufinamitin in-vivo farmakokinetik salım çalışmalarında kullanılan miktar tayini çalışmaları, Waters marka ve H-Class modeli kütle spektroskopisi (Mass spectroscopy, MS) dedektörlü ultra basınçlı sıvı kromatografi (Ultra pressure liquid chromatography, UPLC) cihazı ile gerçekleştirilmiştir (Yöntem 2).

Miktar tayini yöntemi (Yöntem 1)

Rufinamitin miktarının tayin edildiği in-vitro deneylerin gerçekleştirilmesi için Amerikan Farmakopesinde rufinamit tablet için belirtilen monograftaki yöntem (USP, 2020a) uygulanmış ve HPLC kullanılmıştır. İn-vitro deneyler için Drogan ilaçları Ar-Ge bölümü laboratuvarında bulunan HPLC’de mobil faz oranları, akış hızı, kolon sıcaklığı gibi parametreler değiştirilerek en uygun çalışma şartları belirlenmiştir. Rufinamitin %2 sodyum lauril sülfat içeren saf su çözeltisindeki çözünme ve miktar tayini Çizelge 3.3’deki koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3. Rufinamitin HPLC analiz yöntemi (Yöntem 1) parametreleri

Kolon	C18 5 µm, 4.6*125 mm
Seyreltme çözeltisi	ACN:MeOH:Su (40:50:10)
Mobil faz	MeOH:THF:Tampon (15:5:80) (Tampon:2.7g/L KH ₂ PO ₄)
Akış debisi	1 mL/dakika
Enjeksiyon hacmi	25 µL
Dalga boyu	210 nm
Kolon sıcaklığı	25°C
Alıkonma zamanı	5,5 dakika

Analitik yöntem validasyonu (Yöntem 1)

Validasyon, kullanılan yöntemin devamlı olarak doğru ve güvenilir bir şekilde beklenen sonuçları verdiğinin kanıtlanması için yapılması gereken işlemler bütünüdür. Validasyon işlemleri ile yöntemin geçerliliği ve güvenilirliği kanıtlanmış olur. Validasyon çalışmaları etkin madde miktar tayini ve in-vitro çözünme testi çalışmalarında kullanılan %2 sodyum lauril sülfat içeren saf su çözeltisinde yapılmıştır.

Doğrusallık ve aralık

Analitik yöntemin doğrusallığı, belirli bir aralık içinde numunedeki analitin konsantrasyonu ile doğru orantılı olan test sonuçları elde etme yeteneğidir. Doğrusallık parametresini göstermek için %2 sodyum lauril sülfat içeren saf su çözeltisinde içinde rufinamitin stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerden uygun seyreltmeler yapılarak 6 farklı derişimde (0,02-0,05-0,12-0,24-0,27-0,29 mg/mL) çözeltiler hazırlanmış ve HPLC'ye enjekte edilmiştir. İlaveten analitik yöntemin tayin edilen bileşen için doğrusallık, doğruluk ve kesinliğin elde edilebildiği alt ve üst derişimler arasındaki aralığın tespit edilmesi için doğrusallık çalışmasının alt ve üst sınır çözeltilerinin 6'şar enjeksiyonunun RSD'si hesaplanmıştır. Derişimlere karşılık gelen pik alanları bulunmuştur. Elde edilen dedektör yanıtına göre derişim/alan grafiği çizilerek kabul kriterine uygunluğu test edilmiştir. Gerekli istatistiksel parametreler hesaplanmıştır.

Doğruluk ve geri elde

Analitik yöntemin doğruluğu, örnek içindeki analiz edilecek maddenin hazırlanan derişimi ile tayin neticesi bulunan derişimin birbiri ile uyum yakınlığı şeklinde ifade edilir. Miktar tayini yönteminin doğruluğu geri elde etme yüzdesine bağlıdır. Rufinamitin %2 sodyum lauril sülfat içeren saf su çözeltisinde %10, %100 ve %120 seviyelerinde ve her bir seviyeden 3'er adet olacak şekilde test çözeltileri etkin maddenin plaseboya ilave edilmesi yöntemi ile hazırlanıp yöntemde belirtildiği gibi analiz edilmiştir. Gerekli istatistiksel parametrelerle değerlendirilmiştir.

Kesinlik

Analitik yöntemin kesinliği, aynı homojen örnekten yapılan ardışık örneklemelerden elde edilen ölçüm serileri arasındaki uyum yakınlığı (saçınım derecesi) olarak tarif edilir. Bu çalışmada sistem kesinliği, yöntem kesinliği ve laboratuvar içi kesinlik yapılmıştır. Kesinlik ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı ile değerlendirilmiştir.

➤ Deney içi kesinlik (Tekrar edilebilirlik)

Deney içi kesinliği, aynı çalışma şartlarında ve kısa zaman aralığında test edilir. Deney içi kesinliğinde, örnek hazırlama safhasından gelecek hatalardan bağımsız olarak sistem performansının ölçütüdür. Bu amaçla doğrusallık çalışmasındaki %100'lük çözeltinin 6 enjeksiyonu HPLC'ye enjekte edilmiştir. Elde edilen sonuçların ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır.

➤ Deneyler arası kesinlik (Tekrar elde edilebilirlik)

Laboratuvarda deneyler arasındaki rasgele değişimlerin analitik yöntemin kesinliği üzerine etkisini görmek amacıyla aynı homojen numunenin farklı günde, farklı cihazda veya farklı analist tarafından test edilmesidir. Bu parametrelerin tek tek hepsini denemek gerekmez. Bu amaçla aynı laboratuvarda farklı bir günde, aynı analist tarafından farklı bir cihaz ile rufinamitin %2 Sodyum lauril sülfat içeren saf su çözeltisinde 0,24 mg/mL'lik (% 100) derişimde 6 farklı numune hazırlanıp analiz edilmiştir. Elde edilen pik alanlarına karşılık gelen derişimlerin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır.

Özgünlük ve seçicilik

Özgünlük ve seçicilik, analiz edilecek maddenin matris etkisi ve katkı maddelerinin varlığında, ürün içinde tartışmaya yer vermeksizin kesin olarak tayin edilebilirliğidir. Bu amaçla çözücü, plasebo, test çözeltisi ve standart çözeltisi ayrı ayrı HPLC'ye enjekte edilmiştir. İlaveten hazırlanan numunelerin HPLC sisteminde tıkanmalara yol açmaması amacıyla gerçekleştirilen filtrasyon çalışmasında kullanılan filtrenin tespiti amacıyla test çözeltisi, standart çözeltisi, çözücü (blank) ve plasebo çözeltileri analitik yöntemdeki gibi hazırlanmış, bu çözeltilerin bir miktarı santrifüj edilmiş ve üst faz farklı filtre tipleri ile süzülerek viallere alınarak analiz edilmiş ve % fark hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Fark} = ((AS - AF) / AS) * 100$$

AS : Santrifüj edilen test çözeltisindeki pik alanı

AF : Filtre edilen test çözeltisindeki pik alanı

Teşhis ve tayin sınırı (LOD ve LOQ)

Teşhis sınırı bir analitik yöntemin saptayabileceği en küçük derişim değeri olup, tayin sınırı kantitatif olarak tayin edilebileceği en küçük derişim değerini ifade eder. Teşhis ve tayin sınırı şu denklemlerle hesaplanır.

$$\text{Teşhis sınırı} = (3,3 \times \sigma) / S$$

$$\text{Tayin sınırı} = (10 \times \sigma) / S$$

σ :kalibrasyon aralığındaki en düşük derişimin standart sapması

S:kalibrasyon eğrisinin eğimi

Yöntem sağlamlığı

Bir analitik yöntemin sağlamlığı, yöntem parametrelerinin bilinerek yapılan küçük değışimlerden etkilenmeden kaldığının ölçüsüdür ve analitik yöntemin normal kullanıldığı

sürede güvenilirliğinin göstergesidir. Sağlamlık çalışmasında yöntemin hassas olduğu noktalar tespit edildiğinde bunlar analitik yöntemde kullanıcıya uyarı olarak belirtilmelidir. Analitik yöntemin özelliğine göre yöntem için kritik olduğu düşünülenler parametreler ile çalışılmalıdır ve parametrelerdeki değişiklik oranları yöntemde rutin çalışma sırasında meydana gelebilecek olası küçük sapmaları yansıtacak miktarda olmalıdır.

Çözünme analizleri formülasyon gelişimi çalışmasında yol gösteren çok önemli analizlerdir. Sağlam bir yöntem ile analizlerin gerçekleştirilmesi, yapılan formülasyon gelişimi çalışmalarını daha doğru değerlendirilmesine ve yönlendirilmesine imkân sağlar. Bu nedenle validasyon çalışmasının sağlamlık parametresinde istatistiksel merkezi tekrarlı (CCD, central composite design) deney tasarımı kullanılarak yöntem parametrelerinde Çizelge 3.4’de belirtilen değişiklikler yapılmış ve yapılan bu değişikliklerin sistem uygunluk parametreleri ve test sonuçları üzerinde etkisi istatistiksel sonuçlar ve çoklu değişkenler için geliştirilmiş tasarım alanı (design space) üzerinden incelenmiştir. Tasarım alanı gelişiminde cevap olarak etkin madde alıkonma zamanları, alan değerleri, kuyruklanma faktörü ve teorik plaka sayısı belirlenmiştir.

Çizelge 3.4. İstatistiksel merkezi tekrarlı deney tasarımı kullanılarak yöntem parametrelerinde yapılan değişiklikler

Faktörler	Seviyeler				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
A: Kolon Sıcaklığı (°C)	20	22	25	28	30
B: Mobil Faz THF Oranı (%)	3	4	5	6	7
C: Akış Hızı (mL/dk)	0,90	0,94	1,00	1,06	1,10

Çözelti ve hareketli faz stabilitesi

Analizi yapılacak maddenin stabil olarak analiz şartlarında bekletilme süresi saptanmalıdır. Seçilecek bekletilme süresi analize özgüdür. Eğer etkin madde bu süre ve saklama şartlarında bozulacak olursa bu şartlar limitlendirilir ve yöntemde belirtilir. Bu amaçla rufinamitin %2 sodyum lauril sülfat içeren saf su çözeltisinde 0,24 mg/mL’lik (% 100) derişimdeki test ve standart çözeltileri stabilite çalışmalarında kullanılmıştır. Çözeltiler 25°C sıcaklıkta 5, 10 ve 15 saat sürelerde bekletilmiş ve miktar tayini Yöntem 1’e göre HPLC ile tayin edilmiştir.

Miktar tayini yöntemi (Yöntem 2)

Bu yöntem in-vivo deneylerde kullanılmak için geliştirilmiştir. Rufinamitin in-vivo çalışmalardan elde edilen örneklerle miktar tayini, literatürde belirtilen UPLC-MS yöntemi (Gall, Vancea, Dogaru ve Szilagy, 2013) modifiye edilerek Çizelge 3.5'te belirtilen koşullarda yapılmıştır. Çalışmalar Drogosan ilaçları Ar-Ge bölümü laboratuvarında bulunan UPLC-MS sistemi ile gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.5. Rufinamitin biyoanalitik tayininde kullanılan UPLC-MS yöntemi (Yöntem 2) parametreleri

Kolon	C18 5 µm, 4,6*125 mm
Mobil faz	Metanol: Su: Formik asit (40:60:0,1 h/h)
Akış debisi	1 mL/dakika
Kolon sıcaklığı	40°C
Enjeksiyon hacmi	50 µL
Kaynak Sıcaklığı	120°C
Desolvasyon sıcaklığı	450°C
Kon gaz akış debisi	50 L/saat
Desolvasyon gazı akış debisi	600 L/saat
Kon Voltaj	25 V
Alıkonma zamanı	4 dakika

Analiz için plazma numunelerinin elde edilmesi

Wistar türü sıçanlardan alınan kan numuneleri heparinli tüplere konarak 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve plazmanın ayrılması sağlanmıştır. Elde edilen plazma toplanıp -80°C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

Analiz edilecek etkin madde içeren plazma numunesinin hazırlanması

Etkin maddenin metanol içerisinde farklı derişimlerde çözeltisi hazırlanmıştır. 200 µL plazma üzerine etkin madde içeren 300 µL çözelti ve 500 µL metanol ilave edilerek numuneler hazırlanmıştır. Numuneler 30 saniye vorteks karıştırıcı ile karıştırılmıştır ve 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım alınıp 0,22 µm'lik membran filtreden süzölmüştür. Hazırlanan bu analiz numunesinin 500 µL'si UPLC-MS

sistemine enjekte edilerek analiz edilmiştir. İn-vivo çalışmalar için WATERS H-Class UPLC-MS cihazı kullanılmıştır.

Biyoanalitik yöntemin validasyonu (Yöntem 2)

Kullanılan yöntemin kabul edilebilirliğini sağlayan validasyon parametrelerinden, doğrusalılık, doğruluk, ekstraksiyon etkinliği, kesinlik, özgünlük ve seçicilik, teşhis ve tayin sınırı ve plazma numunelerinin stabilitesi incelenmiştir.

Doğrusallık

Doğrusallık, belirli bir derişim aralığı içerisindeki numuneler ile elde edilen yanıtın orantılı olduğunun ifadesidir. Rufinamitin plazma içerisindeki 10 farklı derişimde (0,015-0,040-0,10-0,20-0,50-1,00-1,60-2,00-4,00-6,00 µg/mL) 3 ayrı seri çözeltisi hazırlanmıştır ve UPLC-MS'e enjekte edilmiştir. Derişimlere karşılık gelen pik alanları bulunmuştur. Rufinamitin farklı derişimlere karşılık elde edilen pik alanlarına en küçük kareler yöntemi uygulanmıştır ve standart doğru denklemi elde edilmiştir. Gerekli istatistiksel parametreler hesaplanmıştır.

Doğruluk ve ekstraksiyon etkinliği (Geri elde)

Analiz yönteminin doğruluğu, ölçülen değerin, gerçek değere yakınlığıdır. Miktar tayini yönteminin doğruluğu geri elde etme yüzdesine bağlıdır. Rufinamitin plazma içerisinde hazırlanan 0,04 µg/mL (LLOQ), 1 µg/mL ve 2 µg/mL rufinamit içeren çözeltileri UPLC-MS'e enjekte edilmiş ve elde edilen pik alanlarından kalibrasyon denklemi kullanılarak ekstraksiyon etkinliği hesaplanmıştır.

Kesinlik

Kesinlik, bir yöntemin birbirini izleyen ölçümleri arasındaki yakınlığın derecesini ifade etmektedir. Analitik yöntemin kesinliğini tayin etmek amacıyla deney içi ve deneyler arası kesinlik çalışmaları yapılmıştır.

➤ Deney içi kesinlik (Tekrar edilebilirlik)

Rufinamitin deney içi kesinliğini incelemek için sıçan plazması içerisindeki stok çözeltisinden uygun seyreltmeler yapılarak hazırlanan 1 µg/mL derişimdeki çözeltisi arka arkaya 6 kez UPLC-MS'e enjekte edilmiştir. Elde edilen sonuçların ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır.

➤ Deneyler arası kesinlik (Tekrar elde edilebilirlik)

Rufinamitin plazma içerisinde 1 µg/mL derişimlerde çözeltileri hazırlanmıştır. Bu numuneler birbirini takip eden 2 gün içerisinde 6'şar kez UPLC-MS'e enjekte edilmiştir. Elde edilen pik alanlarına karşılık gelen derişimlerin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır.

Özgünlük ve seçicilik

Kullanılan analiz yönteminin sadece analiz etmek istenilen maddeyi saptaması gerekmektedir. Numune içinde var olan diğer maddelerin aynı dalga boyunda saptanıp saptanmadığının kontrolü yapılmıştır. Bu amaçla blank plazma, mobil faz ve etkin madde içeren standart çözeltisi UPLC-MS sistemine enjekte edilmiştir.

Teşhis ve tayin sınırı

Teşhis bir analitik yöntemin saptayabileceği en küçük derişim değeri olup tayin sınırı (Vendrame ve diğerleri) ve kantitatif olarak tayin edilebileceği en küçük derişim değeri (LOQ) ile ifade edilir. Teşhis ve tayin sınırı aşağıdaki denklemlerle hesaplanır.

$$\text{Teşhis sınırı (LOD)} = (3,3 \times \sigma) / S$$

$$\text{Tayin sınırı (LOQ)} = (10 \times \sigma) / S$$

σ:kalibrasyon aralığındaki en düşük derişimin standart sapması

S:kalibrasyon eğrisinin eğimi

Plazma örneklerinin stabilitesi

Rufinamitin plazma içerisindeki stabilitesi otomatik örnekleyici stabilitesi ve dondurma-çözdürme stabilitesi olmak üzere iki ayrı şekilde incelenmiştir. Otomatik örnekleyici stabilitesinin incelenmesi amacıyla 0,04µg/mL, 1µg/mL ve 2µg/mL derişimlerinde numuneler 4°C otomatik örnekleyicide belirli süre bekletilmiş ve belirlenen zaman aralıklarında miktar tayini Yöntem 2'ye göre UPLC-MS ile tayin edilmiştir. Dondurma-çözme stabilitesinin incelenmesi için 1µg/mL derişimde hazırlanan çözeltiler belirli sayıda -18°C'de dondurulup çözülmüş ve miktar tayini Yöntem 2'ye göre UPLC-MS ile tayin edilmiştir.

3.2.3. Referans ürün karakterizasyonu

Referans ürün olan Inovelon® Film Tablet (Eisai, Japonya) için kalitatif ve kantitatif içerik bilgisine ürüne ait özet ürün özellikleri, literatür ve patent taraması (Portman, Hoffmeier, Burkhard, Sherrer ve Szelagiewicz, 2004) sonucu ulaşılmıştır. Farmakokinetik özellikler literatürden elde edilmiştir. Fizikokimyasal karakterizasyonu için ağırlık, sertlik, su miktarı ile birlikte miktar tayini, ilgili bileşikler ve çözünme özelliği incelenmiştir.

3.2.4. Formülasyon geliştirme çalışmaları öncesinde risk analizleri

Formülasyon geliştirme çalışmaları Tasarımla Kalite (QbD) prensipleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Bu anlamda Uluslararası uyum konferansı (International conference on harmonization, ICH) tarafından yayımlanan ICH Q8 kılavuzu (EMA, 2017) ile Amerika Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration, FDA) tarafından yayımlanan örnek QbD gelişim başvuru dokümanları (FDA, 2012) (FDA, 2011) referans alınmıştır.

Bu kapsamda aşağıdaki şekilde sistematik bir risk analizi yaklaşımı uygulanmıştır.

- Öncelikle tüm varyasyon kaynaklarının tespit edilmesi amacıyla kalitatif bir risk analizi yöntemi olan “balık kılçığı diyagramı (*Ohtsuka ve diğerleri*)” çizilmiştir (*Yazılım: Xmind® 8 (Version Update 4)*).

- Ardından kalite hedefli ürün profili (Quality target product profile, QTPP) ve kritik kalite özellikleri (Critical quality attributes, CQAs) yarı kantitatif bir risk analizi yöntemi olan “sebep-sonuç matrisi” yardımıyla incelenmiştir.
- Daha sonra kritik materyal özellikleri (Critical material attributes, CMAs) ve kritik proses parametreleri (Critical process parameters, CPPs) kantitatif bir risk analizi yöntemi olan “Lean QbD®” ile tespit edilmiştir (Yazılım: LeanQbD®, 2015).

Gerçekleştirilen risk analizi sonrası kritik bulunan parametrelerle ilgili kontrol stratejisi belirlenmiştir.

3.2.5. Plasebo filament formülasyonlarının geliştirilmesi üzerine çalışmalar

Çalışmanın amacı en yüksek çözünmeye sahip 3DP formülasyonun geliştirilmesidir. Bu amaçla çözünmeyi artırabilecek farklı polimer, plastikleştirici ve sürfaktanların etkisi incelenmek istenmiştir. Bu amaçla öncelikle plasebo formülasyonlar ile filament elde edilebilirlik taraması yapılmış, ardından uygun yardımcı maddelere rufinamit eklenerek geliştirme çalışmasına devam edilmiştir.

Plasebo filament formülasyon çalışmalarında ilk aşamada polimer seçimi yapılmak istenmiştir. Bu amaçla denenen polimerlere ait fizikokimyasal özellikler Çizelge 3.6’da, hazırlanan formülasyonlara ait kantitatif içerikler Çizelge 3.7’de verilmiştir. Polimer seçiminin ardından seçilen polimer ile plastikleştirici seçimi yapılmıştır. Bu amaçla denenen plastikleştiricilere ait fizikokimyasal özellikler Çizelge 3.8’de, hazırlanan formülasyonlara ait kantitatif içerikler Çizelge 3.9’da verilmiştir. Polimer ve plastikleştirici seçiminin ardından, sürfaktan seçimi yapılmıştır. Bu amaçla denenen sürfaktanlara ait fizikokimyasal özellikler Çizelge 3.10’da, hazırlanan formülasyonlara ait kantitatif içerikler Çizelge 3.11’de verilmiştir.

Çizelge 3.6. Farklı polimerlere ait fizikokimyasal özellikler

	Molekül Ağırlığı	Suda Çözünürlük	Partikül boyutu d(50)	Viskozite	Erime Derecesi
Eudragit® E PO	47.000 g/mol (Ph.Eur., 2018)	pH 5,0'a kadar çözünür. pH 5,0'in üzerinde şeker ve emilir (Evonik, 2020)	< 50 µm (Evonik, 2019)	3-6 mPa.s (Evonik, 2019)	57°C (Tg) (Parikh, Gupta, Meena ve Serajuddin, 2014)
PEG-8000	7000-9000 g/mol (Dow, 2020b)	Suda çözünür (Dow, 2020b)	-	500-900 mPa.s (Dow, 2020b)	55-62°C (Dow, 2020b)
Pearlitol® Flash	Mannitol (%80): 182.17 g/mol (Roquette, 2020c) Mısır nişastası (%20): 692.7 g/mol (Pubchem, 2020b)	Mannitol: 0,18 g/mL (Roquette, 2020c) Mısır nişastası: Çözünmez (Pubchem, 2020b)	200 µm (Roquette, 2020b)	-	Mannitol: 165-169°C (Roquette, 2020c) Mısır nişastası: 256-258 °C (Worldofchemicals, 2020)
Ludiflash® (BASF, 2020d)	Mannitol (%90): 182.17 g/mol (Roquette, 2020c), Krospovidon (%5): - PVA (%5): 200000 g/mol 58.000 g/mol (Ashland, 2014)	Mannitol: 0,18 g/mL (Roquette, 2020c), Krospovidon: Suda çözünmez (BASF, 2008:17-134) PVA: Suda çözünmez (BASF, 2020d) Suda çözünür (Ashland, 2014)	Mannitol: - Krospovidon: 110-130 µm (BASF, 2020a) PVA: 150 nm 80 µm (Ashland, 2014)	Mannitol: - Krospovidon: - PVA: 2-50 mPa.s 5,5 -8,5 mPa.s (BASF, 2008:17-134)	Mannitol: 165-169°C (Roquette, 2020c) Krospovidon: - PVA: 57°C (Tg)
PVP K-12	2000-3000 g/mol (BASF, 2011:67-117)	Suda çözünür (BASF, 2011:67-117)	-	1,3 -2,3 mPa.s (BASF, 2008:17-134)	90°C (Tg) (BASF, 2012:10-100)
PVP K-17	7000-11000 g/mol (BASF, 2011:67-117)	Suda çözünür (BASF, 2011:67-117)	-	1,5 -3,5 mPa.s (BASF, 2008:17-134)	138°C (Tg) (BASF, 2012:10-100)
Kollidon® VA64	45000 g/mol (BASF, 2012:10-100)	Suda çözünür (BASF, 2008:17-134)	50-65 µm (BASF, 2008:17-134)	1,178-1,255 mPa.s (BASF, 2008:17-134)	101°C (Tg) (BASF, 2012:10-100)
Kollicoat® IR	45000 g/mol (BASF, 2007:15-65)	Suda çözünür (BASF, 2007:15-65)	120 µm (BASF, 2007:15-65)	Maks. 2500 mPa.s (BASF, 2007:15-65)	209°C (BASF, 2007:15-65)
Hidroksiipropil metilselüloz	< 100 g/mol (Dow, 2020a)	Suda çözünmez (Dow, 2020a)	104 µm (Dow, 2020a)	-	115°C (Tg) (Dow, 2020a)
Hidroksiipropil selüloz	80000 g/mol (Ashland, 2017)	Suda çözünür (Ashland, 2017)	45 - 90 µm (Ashland, 2019b)	300-600 mPa.s (Ashland, 2017, 2019a)	150°C (Ashland, 2017)
Polivinil alkol 26-88	200000 g/mol (BASF, 2011:67-117)	Suda çözünmez (BASF, 2020d)	150 nm (BASF, 2011:67-117)	2-50 mPa.s (BASF, 2011:67-117)	57°C (Tg) (BASF, 2011:67-117)
Soluplus®	118000 g/mol (BASF, 2019)	Suda çözünür (BASF, 2019)	340 µm (BASF, 2019)	< 250 mPa.s (BASF, 2019)	70°C (Tg) (BASF, 2019)

Çizelge 3.7. Farklı polimerleri içeren plasebo formülasyonlara ait içerikler (%)*

	PL-01	PL-02	PL-03	PL-04	PL-05	PL-06	PL-07	PL-08	PL-09	PL-10	PL-11	PL-12	PL-13
Eudragit® E PO	93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEG-8000	-	93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pearlit® Flash	-	-	93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ludiflash®	-	-	-	93	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PVP K-30	-	-	-	-	93	-	-	-	-	-	-	-	-
PVP K-12	-	-	-	-	-	93	-	-	-	-	-	-	-
PVP K-17	-	-	-	-	-	-	93	-	-	-	-	-	-
Kollidon® VA64	-	-	-	-	-	-	-	93	-	-	-	-	-
Kollicoat® IR	-	-	-	-	-	-	-	-	93	-	-	-	-
Hidroksipropil metilselüloz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	93	-	-	-
Hidroksipropil selüloz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	93	-	-
Polivinil alkol 26-88	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	93	-
Soluplus®	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	93

*Bütün formülasyonlar, %7 oranında plastikleştirici bir madde olan Triasetin içermektedir.

Çizelge 3.8. Farklı plastikleştiricilere ait fizikokimyasal özellikler

	Molekül Ağırlığı	Suda çözünürlük
Triasetin	218 g/mol (Pubchem, 2020f)	58 mg/mL (Pubchem, 2020f)
Trietil sitrat	276 g/mol (Pubchem, 2020g)	65 mg/mL (Pubchem, 2020g)
PEG-6	300 g/mol (BASF, 2015)	Çözünür (BASF, 2015)
PEG-400	400 g/mol (BASF, 2012:10-100)	Çözünür (BASF, 2012:10-100)
PEG-4000	4000 g/mol (Dow, 2020c)	66 mg/mL (Dow, 2020c)

Çizelge 3.9. Farklı plastikleştiriciler içeren plasebolara ait içerikler (%)*

	PL-14	PL-15	PL-16	PL-17	PL-18
Triasetin	7,0	-	-	-	-
Trietil sitrat	-	7,0	-	-	-
PEG-6	-	-	7,0	-	-
PEG-400	-	-	-	7,0	-
PEG-4000	-	-	-	-	7,0

*Bütün formülasyonlar % 25 oranında HPMC, %25 oranında Kollidon® VA 64 ve %43 oranında Soluplus® içermektedir.

Çizelge 3.10. Farklı sürfaktanlara ait fizikokimyasal özellikler

	Molekül Ağırlığı	Suda çözünürlük	HLB	CMC	Erime Sıcaklığı
Poloksamer P407	12000 g/mol (BASF, 2012:10-100)	Çözünür (BASF, 2012:10-100)	22 (Almeida, Magalhaes, Veiga ve Figueiras, 2018)	2.8* 10 ⁻⁶ M (Almeida ve diğerleri, 2018)	55°C (Tg) (BASF, 2013)
Poloksamer P188	8500 g/mol (BASF, 2012:10-100)	Çözünür (BASF, 2012:10-100)	29 (Almeida ve diğerleri, 2018)	4.8* 10 ⁻⁴ M (Almeida ve diğerleri, 2018)	55°C (Tg) (BASF, 2013)
Polioksil hint yağı	2500 g/mol (BASF, 2020c)	Çözünür (BASF, 2020c)	12-14 (BASF, 2020c)	% 0,02 (BASF, 2020b)	-
PEG-40 Hidrojene hint yağı	2900 g/mol (BASF, 2011:67-117)	Çözünür (BASF, 2012:10-100)	14-16 (BASF, 2011:67-117)	%0,02 (BASF, 2011:67-117)	20-25°C (BASF, 2011:67-117)
Polisorbat 80	605 g/mol (Pubchem, 2020d)	Suda karışır (BASF, 2016)	15 (BASF, 2016)	0,015 M (BASF, 2016)	-
Transcutol	134 g/mol (Sigma-Aldrich, 2020)	Suda karışır (Pubchem, 2020c)	4.2 (Javadzadeh ve diğerleri, 2015: 195-205)	-	-
Sodyum lauril sülfat	288 g/mol (Pubchem, 2020e)	Suda karışır (Pubchem, 2020e)	40 (Javadzadeh ve diğerleri, 2015: 195-205)	%0,5 (Alizadeh, Shayanfar ve Jouyban, 2018)	205°C (Pubchem, 2020e)
Hidroksiipropil betasiklodekstri n	1135 g/mol (Pubchem, 2020a)	Suda serbest çözünür (Roquette, 2020a)	-	-	> 200 °C (Dekompozisyon) (Thurein, Lertsuphotvanit ve Phaechemud, 2018)
PEG-32 Hidrojene palm gliseritleri	300-4000 g/mol (Abitec, 2015)	-	13 (Vasoya ve diğerleri, 2019)	-	50°C (Vasoya ve diğerleri, 2019)
Lauroil makrogol-32 gliseritleri	-	Suda çözünmez (Gattefosse, 2015b)	14	70 mg/L (Gattefosse, 2019)	43°C (Gattefosse, 2019)
PEG monostearat	-	Suda çözünür (Gattefosse, 2015b)	16	153 mg/L (Gattefosse, 2015a)	45°C (Gattefosse, 2015a)
Stearoil polioksil-32 gliseritleri	-	Suda çözünmez (Gattefosse, 2015b)	13	100 mg/L (Gattefosse, 2020)	46-51 °C (Gattefosse, 2020)

Çizelge 3.11. Farklı sürfaktanları içeren plasebo formülasyonlara ait içerikler (%)

	PL-19	PL-20	PL-21	PL-22	PL-23	PL-24	PL-25	PL-26	PL-27	PL-28	PL-29	PL-30
Poloksamer P407	4,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Poloksamer P188	-	4,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Polioksil hint yağı	-	-	4,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEG-40 Hidrojene hint yağı	-	-	-	4,0	-	-	-	-	-	-	-	-
Polisorbat 80	-	-	-	-	4,0	-	-	-	-	-	-	-
Transcutol	-	-	-	-	-	4,0	-	-	-	-	-	-
Sodyum lauril sülfat	-	-	-	-	-	-	4,0	-	-	-	-	-
Hidroksipropil betasiklodekstrin	-	-	-	-	-	-	-	4,0	-	-	-	-
PEG-32 Hidrojene palm gliseritleri	-	-	-	-	-	-	-	-	4,0	-	-	-
Lauroil makrogol-32 gliseritleri	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,0	-	-
PEG monostearat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,0	-
Stearoil polioksil-32 gliseritleri	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,0

*Bütün formülasyonlar % 23 oranında HPMC, %23 oranında Kollidon® VA 64, %43 oranında Soluplus® ve %7 oranında Triasetin içermektedir.

Plasebo formülasyonlar üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda hem hızlı çözünebilecek hem de 3DP işlemi için yeterli dayanıklılığa sahip filamentlerin “HPMC, Soluplus® ve Kollidon® VA64” karışımı ile elde edilebileceği tespit edilmiştir.

Bu karışım için denenen plastikleştiriciler incelendiğinde, en uygun plastikleştirici maddenin “Triasetin” olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla rufinamit yüklenecek formülasyonlardaki polimer karışımının “HPMC, Soluplus® ve Kollidon® VA64” ve plastikleştiricinin “Triasetin” olmasına karar verilmiştir.

Çalışma kapsamında son olarak çözünmenin artırılması için formülasyona sürfaktan eklenmiştir. Eklenen sürfaktanlar arasında filament elde edilebilen optimum sürfaktan seçimi, rufinamit yüklenen formülasyonlarda çözünme davranışlarının karşılaştırılması ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. Rufinamit yüklü 3DP tablet formülasyonlarının geliştirilmesi üzerine çalışmalar

Plasebo formülasyonlar üzerinden filament elde edilebilen yardımcı maddelerin tespit edilmesinin ardından, uygun yardımcı maddelerle rufinamit içeren 3DP tablet formülasyonları çalışılmıştır.

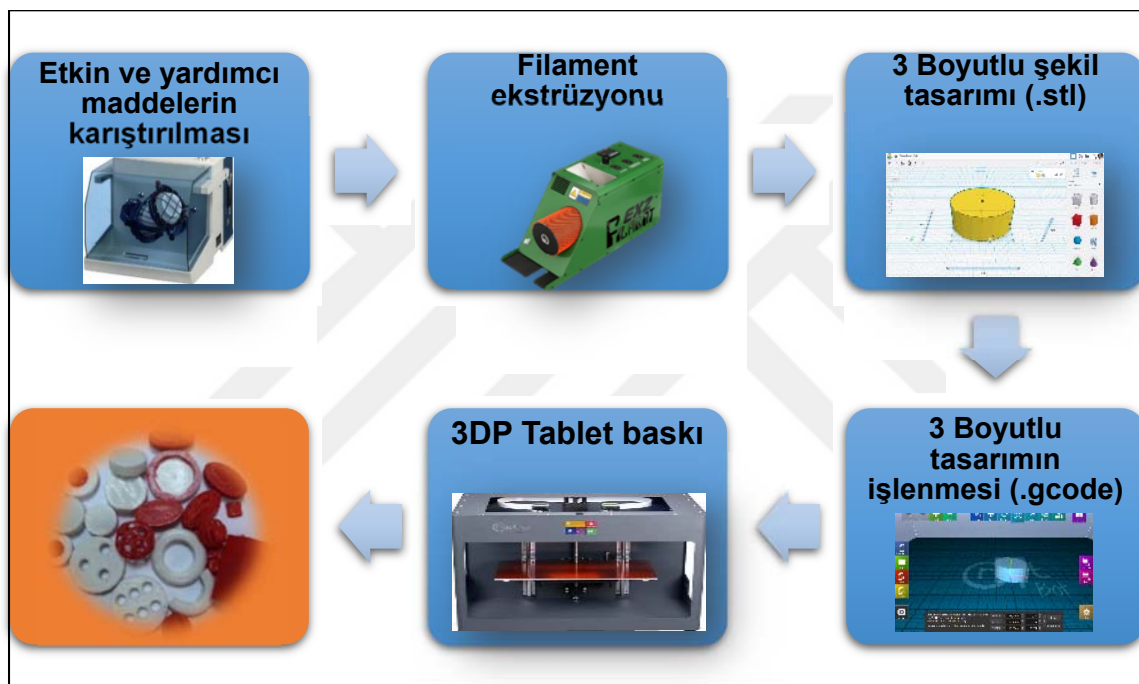
Rufinamit yüklü 3DP tabletlerin hazırlanmasında FDM yöntemi kullanılmıştır. FDM ile 3DP tablet üretilmesi yönteminde öncelikle etkin madde ve yardımcı maddeler uygun bir karıştırıcıda karıştırılmıştır. Ardından Gazi üniversitesi eczacılık faültesi farmasötik teknoloji bölümünde bulunan ekstrüder aracılığıyla 120°C ekstrüzyon sıcaklığında ve 20 rpm ekstrüzyon hızında 1,75 mm çapında filamentler haline getirilmiştir.

Elde edilen filamentler 3DP cihazına yüklenerek aşağıdaki parametrelerle tabletler elde edilmiştir:

- Baskı sıcaklığı : 215°C
- Tabla sıcaklığı : 60°C
- Ekstrüder çapı : 0,4 mm
- Ekstrüder hızı : 60 mm/sn
- Gezici hızı : 120 mm/sn

- Rezolüsyon : 0,2 mm
- Kovan sayısı : 4
- Kovan kalınlığı : 0,8 mm

Tabletlerin üç boyutlu çizimleri, Thinkercad® yazılımı ile “.stl” formatında hazırlanmış, ardından bu yazılım Craftware® (19.11.19 Version 1.22) yazılımı ile 3DP cihazının okuyabileceği “.gcode” formatına dönüştürülmüştür. Üretim akış şeması Şekil 3.1’de şematize edilmiştir.



Şekil 3.1. FDM-3DP yöntemi ile tabletlerin hazırlanması

Rufinamit içeren formülasyon çalışmalarında ilk aşamada farklı sürfaktanların çözünme üzerinde etkisi incelenmek istenmiştir. Bu amaçla hazırlanan formülasyonlara ait kantitatif içerikler Çizelge 3.12’de verilmiştir.

Sürfaktan seçiminin ardından, sürfaktan oranlarının çözünme üzerinde etkisi incelenmiştir. Bu amaçla hazırlanan formülasyonlara ait kantitatif içerikler Çizelge 3.13’te verilmiştir.

Sürfaktan tipi ve oran tespitinin ardından, formülasyonda dispersant olarak kullanılan “Kollidon® VA64” maddesinin çözünme üzerinde etkisi incelenmek istenmiştir. Bu amaçla hazırlanan formülasyonlara ait kantitatif içerikler Çizelge 3.14’te verilmiştir.

Çizelge 3.12. Rufinamit yüklü formülasyonlarda farklı sürfaktanların çözünme üzerinde etkisinin incelenmesi için hazırlanan formülasyonlara ait içerikler (%)

	PEG-40 Hidrojene hint yağı	Polisorbat 80	Lauroil makrogol-32 gliseritleri	PEG monostearat	Stearoil polioksil-32 gliseritleri
A01	4,0	-	-	-	-
A03	-	4,0	-	-	-
A04	-	-	4,0	-	-
A05	-	-	-	4,0	-
A06	-	-	-	-	4,0

*Bütün formülasyonlar % 15 oranında rufinamit, %20 oranında HPMC, %20 oranında Kollidon® VA 64, %34 oranında Soluplus® ve %7 oranında Triasetin içermektedir.

Çizelge 3.13. Rufinamit yüklü formülasyonlarda farklı sürfaktan oranlarının çözünme üzerinde etkisinin incelenmesi için hazırlanan formülasyonlara ait içerikler (%)

	HPMC	PEG monostearat
A05	20,0	4,0
A07	18,0	6,0
A08	16,0	8,0
A09	14,0	10,0
A10	22,0	2,0
A11	19,0	5,0
A12	24,0	0,0

*Bütün formülasyonlar % 15 oranında rufinamit, %20 oranında Kollidon® VA 64, %34 oranında Soluplus® ve %7 oranında Triasetin içermektedir.

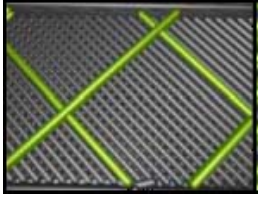
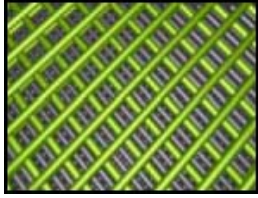
Çizelge 3.14. Dispersant maddenin çözünme üzerinde etkisinin incelenmesi için hazırlanan formülasyonlara ait içerikler (%)

	HPMC	Kollidon® VA64
A17	40,0	0,0

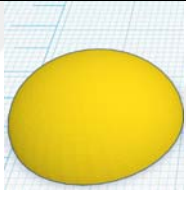
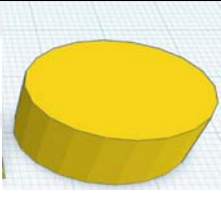
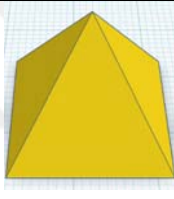
*Bütün formülasyonlar % 15 oranında rufinamit, %34 oranında Soluplus®, %7 oranında Triasetin ve %4,0 oranında PEG monostearat içermektedir.

Bu çalışmaların ardından tespit edilen optimum yardımcı maddelerle 3 boyutlu printer ile üretilen tabletlerin iç dolgu oranları (*infill ratio*) ve dış geometrilerinin çözünme üzerindeki etkisi incelenmek istenmiştir. Bu amaçla hazırlanan farklı iç dolgu oranlarına sahip 3DP

tabletlere ait görüntüler Şekil 3.2’de, farklı dış geometrilerle hazırlanan 3DP tabletlere ait görüntüler Şekil 3.3’te sunulmuştur.

İç dolgu oranı	% 10	% 50	% 100
Yazılım görünümü			
3DP Tablet görünümü			

Şekil 3.2. Farklı iç dolgu oranlarında üretilen tabletlere ait görüntüler

Dış geometri	Yarım küre	Oval	Piramit
Yazılım görünümü			
3DP Tablet görünümü			

Şekil 3.3. Farklı dış geometrilerle üretilen tabletlere ait görüntüler

3.2.7. RUFİNAMİT İÇEREN FILAMENT EKSTRÜZYONU SONRASI EKSTRÜDER TEMİZLİK YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ

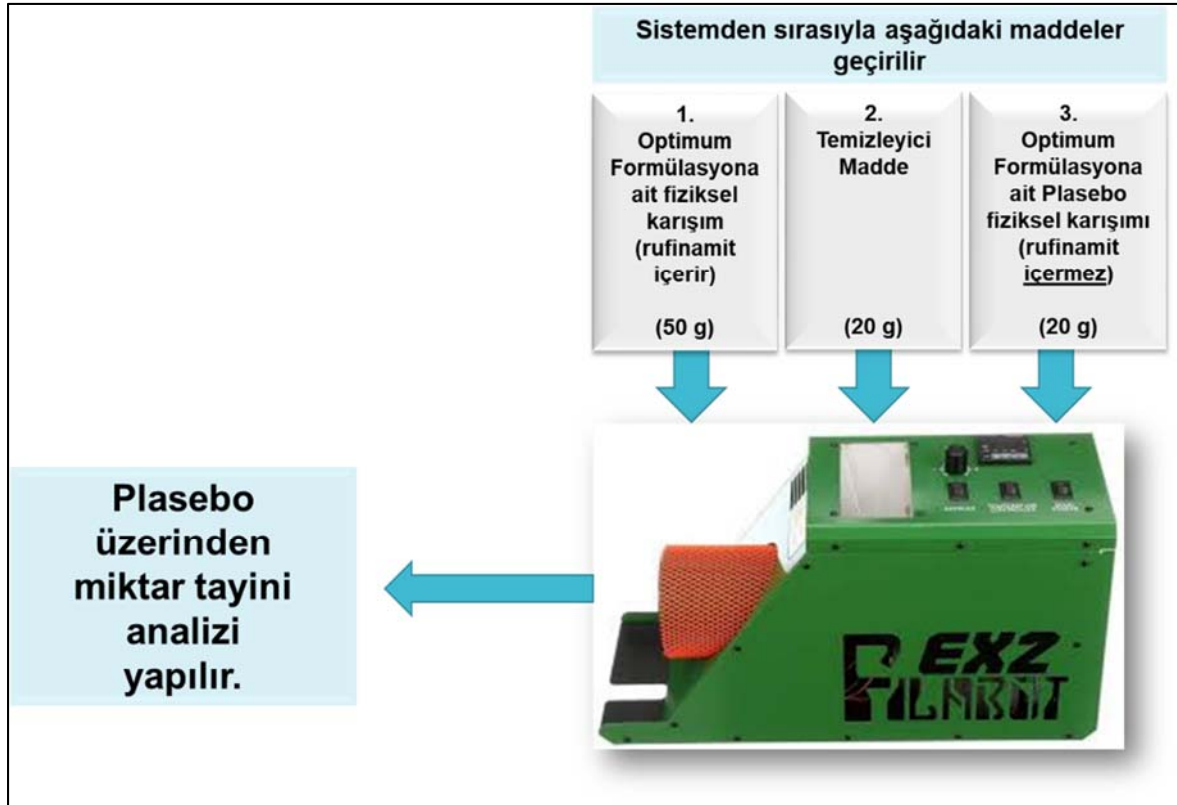
Rufinamit içeren filamentlerin ekstrüzyonunun ardından, ekstrüderin temizlenmesi amacıyla temizlikte kullanılacak temizleyici madde tipi ve miktarı analitik çalışmalarla belirlenmiştir. Bu amaçla Çizelge 3.15’de verilmiş üç farklı tip temizleyici madde üzerinden denemeler yapılmıştır.

Çizelge 3.15. Filament ekstrüderi temizleyici madde tipleri

Temizleyici Madde Tipi	İçerik Bilgisi	Ekstrüzyon Sıcaklığı
HME Cleaner Plus®	HPMC, MC, Propilen glikol, Kolloidal silika (Biogrand, 2017b)	160-170°C (Biogrand, 2017a)
Filabot Dyna-Purge D2®	Yüksek molekül ağırlıklı polimerler (Filabot, 2017)	200°C (Filabot, 2017)
Ultra Purge® 5150	Polietilen (Mouldsplus, 2020)	250°C (160-350°C) (Mouldsplus, 2020)

Ekstrüder temizleme prosedürü aşağıdaki ve Şekil 3.4'deki gibidir:

1. Yaklaşık 50 g ağırlığında Optimum 3DP formülasyonu fiziksel karışımı (rufinamit içerir) 20 rpm ekstrüzyon hızında ve 120°C ekstrüzyon sıcaklığında ekstrüderden geçirilmiştir.
2. Ardından 20 g ilgili temizlik maddesi 20 rpm ekstrüzyon hızında ve kendi ekstrüzyon sıcaklığında ekstrüderden geçirilmiştir. Geçirilen bu materyal atık kabına alınmıştır.
3. Hemen ardından sistemden 20 g Optimum 3DP formülasyonuna ait plasebo fiziksel karışımı (rufinamit içermez) 20 rpm ekstrüzyon hızında ve 120°C ekstrüzyon sıcaklığında ekstrüderden geçirilmiştir. Analiz için ayrılmıştır.
4. 2. ve 3. aşamalar iki defa daha tekrar edilmiştir.
5. Elde edilen plasebo materyali üzerinden, geliştirilen ve valide edilmiş rufinamit miktar tayini yöntemi ile miktar tayini analizi yapılmıştır.
6. En düşük rufinamit kalıntısı bırakan temizlik maddesi tipi ve miktarı, optimum temizlik yöntemi olarak belirlenmiş ve rufinamit içeren tüm filament üretimlerinin ardından bu yöntemle ekstrüderin temizliği sağlanmıştır.



Şekil 3.4. Ekstrüder temizlik yöntemi tespiti prosedürü

3.2.8. Rufinamit içeren konvansiyonel tablet hazırlama yöntemi

Rufinamit yüklü konvansiyonel tabletlerin hazırlanmasında öncelikle etkin madde ve optimum 3DP tablet formülasyonunda kullanılan yardımcı maddeler uygun bir karıştırıcıda karıştırılmış, ardından bu karışıma %1 oranında magnezyum stearat ilave edilerek tekrar karıştırılmıştır. Elde edilen basıma hazır toz Drogasana ilaçları Ar-Ge bölümü laboratuvarında bulunan rotari tablet baskı makinesinde 22 mm uzunluğunda ve 10 mm genişliğinde zımba ile tabletler halinde basılmıştır.

3.3. Optimum Filament ve 3DP Tablet Formülasyonu Üzerinde Yapılan Kontroller

3.3.1. Geçimlilik testleri

DSC analizi

Rufinamit ile hazırlanan 3DP formülasyonlarında kullanılan maddeler arasında etkileşim olup olmadığının incelenmesi için DSC analizleri yapılmıştır. Çalışmalar 10°C/dak tarama hızında 300°C'ye kadar yapılmıştır. Aşağıdaki örnekler 2 mg tartılarak alüminyum örnek kaplarına konulmuştur. Alüminyum kapak kapatılarak aletin ısıtma hücresine yerleştirilmiştir. 25°C -300°C sıcaklık aralığında, 50 mL/dk akışta azot atmosferi altında deneyler gerçekleştirilmiştir.

- Rufinamit: Triasetin 1:1 karışımı
- Rufinamit: Gelucire® 48/16 1:1 karışımı
- Rufinamit: Soluplus® 1:1 karışımı
- Optimum 3DP formülasyonu (A05) fiziksel karışımı
- Optimum 3DP formülasyonu (A05) filamenti
- Optimum 3DP formülasyonu (A05)
- Optimum 3DP formülasyonu (A05) plasebo formülasyonu
- Referans ürün: Inovelon® Film Tablet

XRD analizi

Rufinamit ile hazırlanan 3DP formülasyonlarında kullanılan maddeler arasında etkileşim ve etkin maddenin polimorfik yapısında bir değişim olup olmadığının incelenmesi için XRD analizleri yapılmıştır.

Etkin maddenin kristal modifikasyonu aşağıdaki örnekler üzerinde, XRD cihazı kullanılarak 2,0 rotasyon/dk ölçüm hızında 3°-90° 2-Theta arasında incelenmiştir.

- Optimum 3DP formülasyonu (A05) fiziksel karışımı
- Optimum 3DP formülasyonu (A05) filamenti
- Optimum 3DP formülasyonu (A05)

- Optimum 3DP formülasyonu (A05) plasebo formülasyonu
- Referans ürün: Inovelon® Film Tablet

FTIR spektrumu

Aşağıdaki numunelerin FTIR spektrumları Shimadzu marka ve Prestige modeli ATR-FTIR spektrometresi ile alınmış ve dalga sayısı cm^{-1} cinsinden değerlendirilmiştir.

- Rufinamit
- Optimum formülasyona ait fiziksel karışım (rufinamit içerir)
- Optimum formülasyona ait plasebo fiziksel karışımı (rufinamit içermez)
- Optimum formülasyona ait 3DP tablet
- Referans ürün (Inovelon® Film Tablet)

3.3.2. Filamentlerde yapılan fiziksel testler

Filamentlerin 3DP yöntemi için uygunluklarının tespiti için kalınlık ve mekanik dayanıklılıkları Gülhane eczacılık fakültesi laboratuvarında incelenmiştir. Filamentlerin mekanik dayanıklılıkları tensiyometre yardımıyla “Kopma kuvveti” ve “Uzama yüzdesi” özellikleri üzerinden incelenmiştir. Tensiometrik ölçümlerde kullanılan analiz parametreleri aşağıdaki gibidir:

- Yük aralığı : 100 N
- Uzatma aralığı : 10 mm
- Test hızı : 300 mm/dk
- Gösterge uzunluğu : 250 mm

3.3.3. 3DP tabletlerde yapılan fiziksel testler ve miktar tayini

Hazırlanan tabletlerin ağırlık, sertlik ve su miktarları incelenmiştir. Hazırlanan filamentlerin ve tabletlerin içerdikleri rufinamit miktarı, geliştirilen ve valide edilen miktar tayini yöntemi ile incelenmiştir.

3.3.4. In-vitro çözünme tayini

Tabletlerden rufinamitin in-vitro çözünme tayini yöntem parametreleri aşağıdaki şekildedir. Belirlenen zaman noktalarında ortamdan 5 mL numune çekilmiş, aynı miktarda taze çözelti çözünme ortamına eklenmiştir. Çözünme ortamından alınan numuneler uygun şekilde doyurulmuş bir filtreden süzülerek HPLC sisteminde analiz edilmiştir.

- Aparat Tipi : USP Aparat II (Dönen palet)
- Çözünme Hacmi : 900 mL
- Rotasyon Hızı : 75 rpm
- Çözünme Sıcaklığı : 37 °C
- Numune Alma Noktaları : 15.dak., 30.dak., 45.dak., 1.sa., 2.sa., 6.saç, 24.sa.
- Deney tekrar sayısı : 3 Tekrar
- Çözünme ortamı : Saf Su + %2,0 SLS (FDA, 2020c)

3.3.5. İntrinsik çözünme tayini

Saf etkin madde ve öğütülmüş 3DP tabletlerden rufinamitin intrinsik çözünme tayini Hacettepe üniversitesi eczacılık fakültesi farmasötik teknoloji laboratuvarında yapılmıştır. Bu amaçla kullanılan aparata ait fotoğraf Şekil 3.5, yöntem parametreleri aşağıdaki gibidir:

- Aparat Tipi : Dönen disk (Wood apareyi)
- Baskı Basıncı/ Süresi : 1000 psi, 1 dk
- Yüzey Alan : 0,5 cm²
- Çözünme Hacmi : 900 mL
- Rotasyon Hızı : 200 rpm
- Çözünme Sıcaklığı : 37 °C
- Çözünme Ortamı : %2 SLS ve Saf Su
- Numune Alma Noktaları : 1.Sa-2.Sa-3.Sa-4.Sa-5.Sa



Şekil 3.5. İntrinsik çözünme aparatı

3.3.6. Salım kinetiği

Tüm formülasyonların zamana karşı elde edilen kümülatif salım profilleri sonuçlarından salım kinetikleri belirlenmiştir. Bu amaçla DDSolver[®] programı kullanılmıştır (Siswanto, Fudholi, Nugroho ve Martono, 2015).

3.3.7. In-vitro stabilite çalışmaları

Hazırlanan optimum tabletlerin fizikokimyasal stabilitesi (tablet boyutu, ağırlığı, sertliği, miktar tayini, su miktarı, çözünme) ICH Q1A (R2) kılavuzuna uygun olacak şekilde $25\pm 2^{\circ}\text{C}/\%60\pm 5$ bağıl nem koşulunda 20 ay, $40\pm 2^{\circ}\text{C}/\%75\pm 5$ bağıl nem koşulunda 6 ay süreyle bekletilerek incelenmiştir.

3.3.8. Formülasyonların morfolojik özelliklerinin belirlenmesi

Hazırlanan filament ve 3DP tablet formülasyonlarının şekilleri ve yüzey özellikleri SEM cihazı kullanılarak incelenmiştir. Formülasyonlar, Şekil 3.6’da sunulduğu gibi iki tarafı yapışkan bant aracılığı ile metal levhalar üzerine sabitlenmiş, altın-paladyum karışımı ile kaplanarak fotoğrafları çekilmiştir.



Şekil 3.6. SEM görüntüleme için numunelerin hazırlanışı

3.3.9. Hücre kültürü çalışmaları

Deneylerde Caco-2 insan kolorektal kanser hücre hattı ve Hep G2 insan hepatoselüler karsinoma olmak üzere iki tip hücre dizisi kullanılmıştır. Hücre dizileri ATCC’den (American Tissue Culture Collection) alınmıştır. Bütün deneylerde büyüme fazındaki hücreler kullanılmıştır. Hücre kültürü çalışmaları Hacettepe üniversitesi eczacılık fakültesi farmasötik teknoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Caco-2 ve Hep G2 hücrelerinde rufinamitin sitotoksik etkilerinin MTT testi ile değerlendirilmesi

Sitotoksosite çalışmaları, Caco-2 insan kolorektal kanser hücre hattı ve Hep G2 insan hepatoselüler karsinoma hücre hattı üzerinde gerçekleştirilmiştir.

- Karaciğer hücre hattının seçiminde, etkin maddenin en ciddi yan etkisinin karaciğer toksisitesi olduğu dikkate alınmıştır (Bialer ve diğerleri, 2013). Hep G2 hücre hattı, normal karaciğer parankimal hücrelerine benzer sentez ve plazma proteini sekresyonu yapabilmesi nedenleriyle ksenobiotiklerin incelendiği çalışmalarda sıklıkla tercih edilen bir hücre hattıdır (Nowrouzi ve diğerleri, 2010).
- Caco-2 hücre hattı, oral kullanım için tasarlanan ilaç şekillerinin sitotoksitesinin değerlendirilmesinde L929 hücre hattı ile beraber en çok kullanılan hücre hattıdır (Elsayed, Sharaf-Eldin ve Wadaan, 2015) (Bu, Narayanan, Dalrymple, Cheng ve Serajuddin, 2016) (Fernandes ve diğerleri, 2012). Caco-2 hücre hattının seçilmesinin bir diğer nedeni ise permeabilite çalışmasının yapılacağı Caco-2 hücrelerinin hücre geçiş çalışması esnasında hangi derişimlerde canlı kalabileceğinin görülmesidir.

Saf etkin madde (rufinamit), referans ürün (Inovelon® 200 mg Film tablet) ve optimum 3DP formülasyon (A5-3DP) için MTT testi uygulanmıştır. Çalışma esnasında her iki hücre hattı için de hücre canlılıkları 48 saat boyunca izlenmiştir.

Caco-2 hücreleri yüksek derişimlerde glikoz içeren DMEM besiyeri kullanılarak 25 cm²'lik flasklara ekilmiştir. DMEM besiyeri 4 mM L-Glutamin ve sodyum pirüvat, %10 FBS, % 0,5 penisilin (10,000 ünite) ve streptomisin sülfat (10,000 µg/mL) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Hep G2 hücreleri için düşük derişimlerde glikoz içeren DMEM besiyeri kullanılmıştır. DMEM besiyeri 1 mM L-Glutamin ve Sodyum Pirüvat, %10 FBS, % 0,5 Penisilin (10,000 ünite) ve streptomisin sülfat (10,000 µg/mL) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Hücreler 37 °C'de, % 5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Hücre canlılığı değerlendirilmesi öncesi % 80 doluluğa erişen flasklarda yer alan hücreler % 0,025 derişimde tripsin – EDTA çözeltisi ile kaldırılıp yeniden süspande edildikten sonra tripan mavisi ile muamele edilerek hemositometre yardımıyla hücre sayıları saptanmıştır.

Sitotoksosite testi için 96 kuyucuklu plaklara 5x10³ hücre/mL olacak şekilde ekim yapılmıştır. Ekilen hücreler hücre canlılığı değerlendirmesi öncesi kültür koşulları altında gece boyunca

bekletilmiştir. 24 saatin ardından boşaltılan kuyucuklara besiyeri içerisinde rufinamit, referans ürün (Inovelon®) ve optimum formülasyon (A5-3DP) 100 µL hacimde ve 3 farklı derişimde (1mM, 0,5 mM ve 0,25 mM) çözelti halinde uygulanmıştır. 24 ve 48 saatlik sürelerin sonunda hücre canlılıkları MTT yöntemi (3-[4,5-dimetil tiyazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolyum bromür) ile değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak besiyeri kullanılmıştır.

Formülasyon uygulanan plaklara belirlenen sürelerin sonunda 5µg/mL derişimde 25 µL MTT çözeltisi eklenmiş ve 4 saat bekletilmiştir. 4 saat sonunda canlı hücreler tarafından oluşturulan mor renkli formazan kristallerini çözmek için her bir kuyucuğa 80 µL % 23'lük SDS çözeltisi ilave edilmiştir. Gece boyunca bekletilen plaklarda oluşan mor rengin absorbansı 570 nm'de ELISA plak okuyucu ile ölçülmüştür.

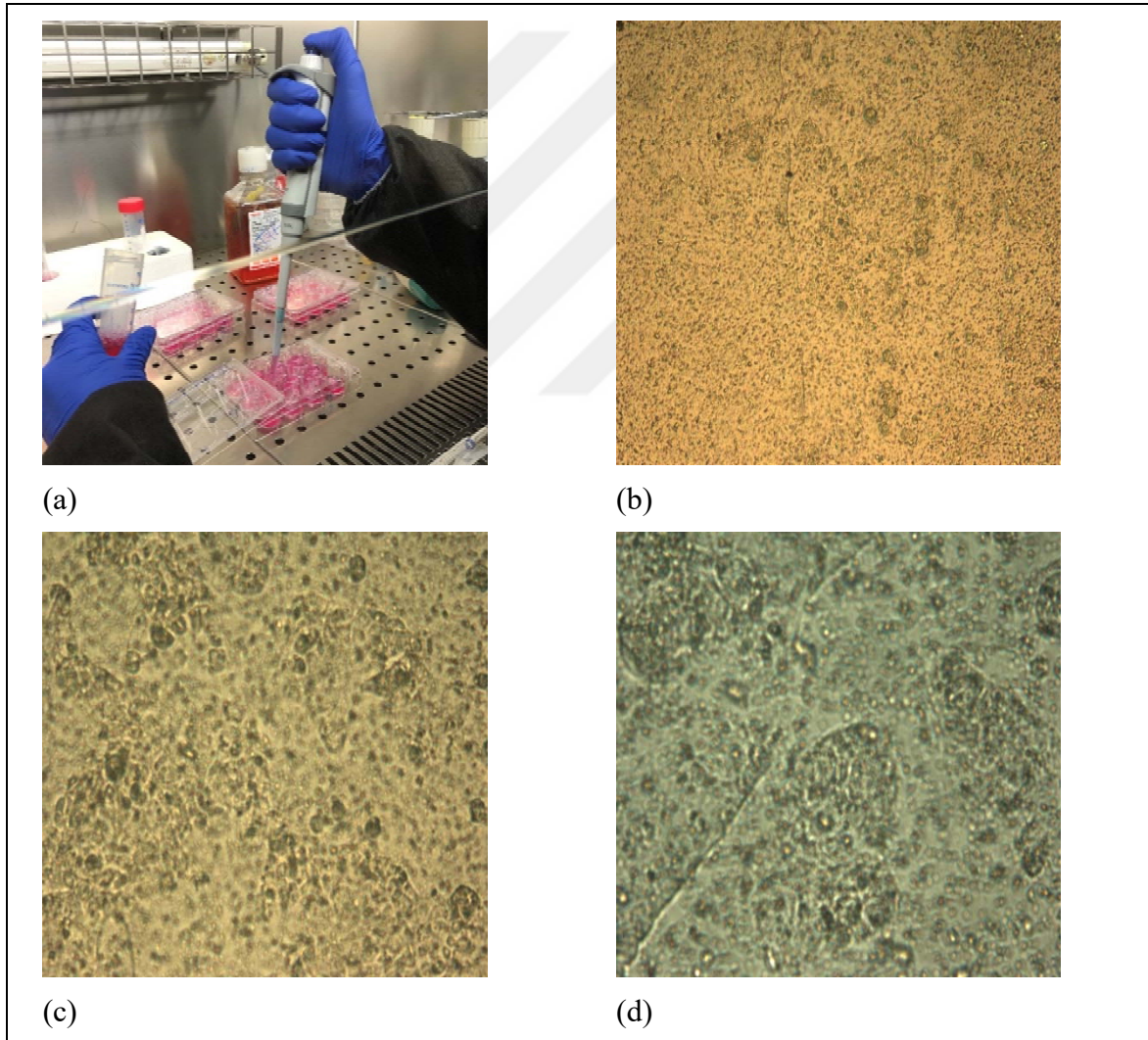
Formülasyonların permeabilite deneyleri

Permeabilite çalışmaları, bağırsak hücrelerinin tek tabakalı yapısını taklit etmesi sebebiyle tercih edilen Caco-2 hücre hattı (pasaj 10-15) ile gerçekleştirilmiştir. Hücreler DMEM besiyeri kullanılarak 75 cm²'lik flasklara ekilmiştir. DMEM besiyeri 4mM L-Glutamin ve Sodyum Pirüvat, %10 FBS, % 0,5 Penisilin (10,000 ünite) ve streptomisin sülfat (10,000 µg/mL) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Hücreler 37 °C'de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. % 80 doluluğa erişen flasklarda yer alan hücreler % 0,025 derişimde tripsin – EDTA çözeltisi ile kaldırılıp yeniden süspande edildikten sonra tripan mavisi ile boyanarak hemositometre yardımıyla hücre sayıları saptanmıştır.

Permeabilite çalışması için tripan mavisi ile sayım yapıldıktan sonra 12x10⁴ hücre/mL olacak şekilde insertlere (ThinCerts, 12 kuyucuk, 1 µM por çapı, transparan) ekim yapılmıştır. Apikal bölüme 0,5 mL ve bazolateral bölüme 1 mL ortam eklenmiştir. Plaklar 37 °C'de, % 5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilmiştir. Kültür ortamı gün aşırı değiştirilmiş ve permeabilite çalışmaları 21 gün sonra hücre tek tabakası doluluğa ulaşınca gerçekleştirilmiştir.

Hücre tek tabakasının bütünlüğü transepitel elektrik direnci (TEER) ölçümü yapılarak değerlendirilmiştir. Caco-2 hücre tek tabakalarının TEER değerleri, Millicell-ERS epitel voltametre ile ölçülmüştür. Çalışma sırasında, elektriksel rezistansı 400 Ω.cm² ve üzeri değerde olan hücre tabakaları kullanılmıştır. 21 gün sonunda apikal ve bazolateral kompartmanlarda bulunan besiyeri boşaltılarak apikal yüze 0,5 mL, bazolateral yüze 1 mL

10 mM HEPES içeren HBSS (fenol kırmızısı içermeyen) uygulanarak hücreler yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrası apikal kompartmana transport ortamı içerisinde 1mM, 0,5 mM ve 0,25 mM derişimde rufinamit içeren etkin madde, referans ürün (Inovelon®) ve hazırlanan formülasyon (A5-3DP) çözeltileri uygulanarak 60 rpm hızda çalkama ile 37 °C'lik su banyosunda 2 saat süreyle bekletilmiştir. 2 saatin sonunda bazolateral kompartmanda yer alan ortam toplanarak geliştirilip valide edilen HPLC yöntemi ile analiz gerçekleştirilmiştir. Hücre tek tabakalarının elektrik rezistansı 2 saatlik inkübasyon süresi ardından tekrar ölçülerek hücre bütünlüğünün korunduğu gösterilmiştir. Hücrelere ait görüntüler Şekil 3.7'de sunulmuştur.



Şekil 3.7. (a) Caco-2 hücrelerinin well-plate'lere ekimi. (b) Caco-2 hücrelerinin faz kontrast görüntüleri (10x) (c) Caco-2 hücrelerinin faz kontrast görüntüleri (20x) (d) Caco-2 hücrelerinin faz kontrast görüntüleri (40x)

3.3.10. Ticari ürün Inovelon® film tablet ve optimum 3DP tablet formülasyonları ile yapılan in-vivo çalışmalar

Wistar albino cinsi erkek sıçanlar kullanılmıştır. İn-vivo deneyler, Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı (Evrak Tarih ve Sayısı: 14/03/2019-E.34144) alınarak yapılmıştır. Deneyler Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Araştırma Ünitesi'nde gerçekleştirilmiştir.

Farmakokinetik çalışmada 250-300 gram ağırlığında Wistar albino cinsi 24 adet erkek sıçan kullanılmıştır. Sıçanlara verilecek doz miktarı, literatüre göre hesaplanarak doz dönüşümü uygulanmıştır (Nair ve Jacob, 2016) (Çizelge 3.16). Hayvanlara ~20 mg/kg ve ~40 mg/kg dozlarda rufinamit içeren ticari ürün Inovelon® ve 3DP tabletleri öğütülüp su ile süspende halde oral yoldan 1 defa verilmiştir.

Çizelge 3.16. Farmakokinetik çalışma için yapılan doz dönüşümü hesabı

Bir Tablette Bulununan Rufinamit Dozu (mg)	İnsan İçin Kilogram Başına Alınan Rufinamit Dozu (mg/kg) (İnsan= 60 kg)	Sıçan İçin Kilogram Başına Alınan Rufinamit Dozu (mg/kg) (Sıçan= İnsan dozu / 0.162)	Optimum 3DP Tablet (A05)		Inovelon® Film tablet	
			Sıçan İçin Kilogram Başına Alınması Gereken Bitmiş Ürün Miktarı (mg/kg) (Rufinamit oranı: %15)	250 g Sıçan İçin Bir Doz Bitmiş Ürün Ağırlığı (mg)	Sıçan İçin Kilogram Başına Alınması Gereken Bitmiş Ürün Miktarı (mg/kg) (Rufinamit oranı: %53)	250 g Sıçan İçin Bir Doz Bitmiş Ürün Ağırlığı (mg)
200	3.3	20	135.80	34	38.43	10
400	6.7	41	275.72	69	78.03	20

Farmakokinetik çalışmalarda sıçanlar Çizelge 3.17'de belirtildiği şekilde gruplara ayrılmıştır.

Çizelge 3.17. Farmakokinetik çalışma için hayvanların gruplandırılması.

Doz*		Gruplar	
İnsan	Sıçan (mg/kg)	1. Grup	2. Grup
200 mg	20,58 mg/kg	N=6, Test (3DP Tablet)	N=6, Referans (Inovelon® Film Tablet)
İnsan	Sıçan (mg/kg)	3. Grup	4. Grup
400 mg	41,15 mg/kg	N=6, Test (3DP Tablet)	N=6, Referans (Inovelon® Film Tablet)

*Doz dönüşümü literatüre uygun gerçekleştirilmiştir (Nair ve Jacob, 2016)

Sıçanlar bir gece açlıktan sonra oral yoldan dozlanmıştır. Farmakokinetik çalışmalar iki sekanslı ve tek periyotlu tasarım şeklinde gerçekleştirilmiştir. Kan örnekleri kuyruk veninden yaklaşık 400µL hacminde 1-2-3-4-6-12-24-36 ve 48. saatlerde Heparin içeren tüplere alınmış, 10000 rpm’de 10 dakika santrifüjlendirilerek hazırlanan plazmalar analiz edileceği zamana kadar -80°C’de saklanmıştır (Gall, Vancea, Szilagyi, Gall ve Kolcsar, 2015) (Wright, Chen, Martinez ve Davies, 2012). Analiz numunelerinde ekstraksiyon metanol ile yapılmıştır. 200µL plazma üzerine 500 µL metanol ilave edilip 30 saniye vorteks karıştırıcı ile karıştırılmış ve 10000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek hazırlanmıştır. Süpernatant kısım alınıp 0,22 µm’lik membran filtreden süzölmüştür. Hazırlanan bu analiz numunesinin 500 µL’si UPLC-MS sistemine enjekte edilerek analiz edilmiştir.

Kan alma görüntüleri Şekil 3.8’de sunulmuştur. Deney sonunda sıçanlar intraperitoneal ksilazin (10 mg/kg) - ketamin (90 mg/kg) uygulaması ile genel anestezi altına alınmış ve kalpten kan alınarak kurban edilmiştir. Farmakokinetik parametrelerin belirlenmesi için Kinetica® Version 5.0 programı kullanılmıştır.



Şekil 3.8. Sıçan kuyruk veninden kan alma görüntüleri



4. BULGULAR

4.1. Ön Formülasyon Çalışmaları

4.1.1. Rufinamitin denge çözünürlük tayini

Rufinamitin farklı ortamlardaki denge çözünürlük değeri Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Rufinamitin farklı ortamlardaki denge çözünürlük değerleri Çizelge 4.1’de sunulmuştur. Rufinamitin çözünürlüğü pH’a bağımlı değildir. Bununla birlikte ortama yüzey etkin madde olarak eklenen SLS ’ye bağlı olarak artmaktadır.

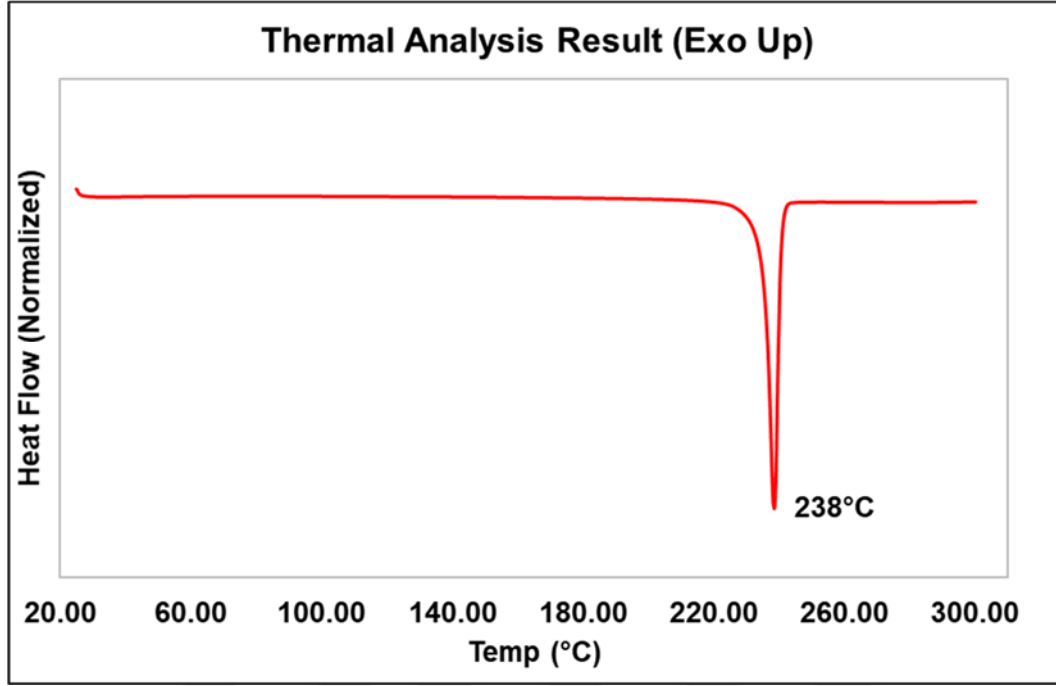
Çizelge 4.1. Farklı çözünürlük ortamlarında rufinamit denge çözünürlük değerleri (T=24. saat) (n=3, ortalama±SS)

Çözünürlük ortamı	Çözünürlük (mg/L)	900 mL’de Çözünebilecek Maksimum Miktar (mg)
Saf su	54,7 ± 0,6	49
0,1 N HCl	54,1 ± 1,9	49
pH 4,5 asetat tamponu	56,1 ± 1,5	50
pH 6,8 fosfat tamponu	57,0 ± 0,3	51
Saf su + %1 (a/h) SLS	210,7 ± 2,3	190
Saf su + %2 (a/h) SLS	676,1 ± 3,5	609
0,1 N HCl + %2 (a/h) SLS	689,1 ± 3,3	620
pH 4,5 asetat tamponu + %2 (a/h) SLS	681,1 ± 3,4	613
pH 6,8 fosfat tamponu + %2 (a/h) SLS	695,6 ± 3,3	626

(SLS: Sodyum lauril sülfat)

4.1.2. Rufinamitin erime derecesi tayini

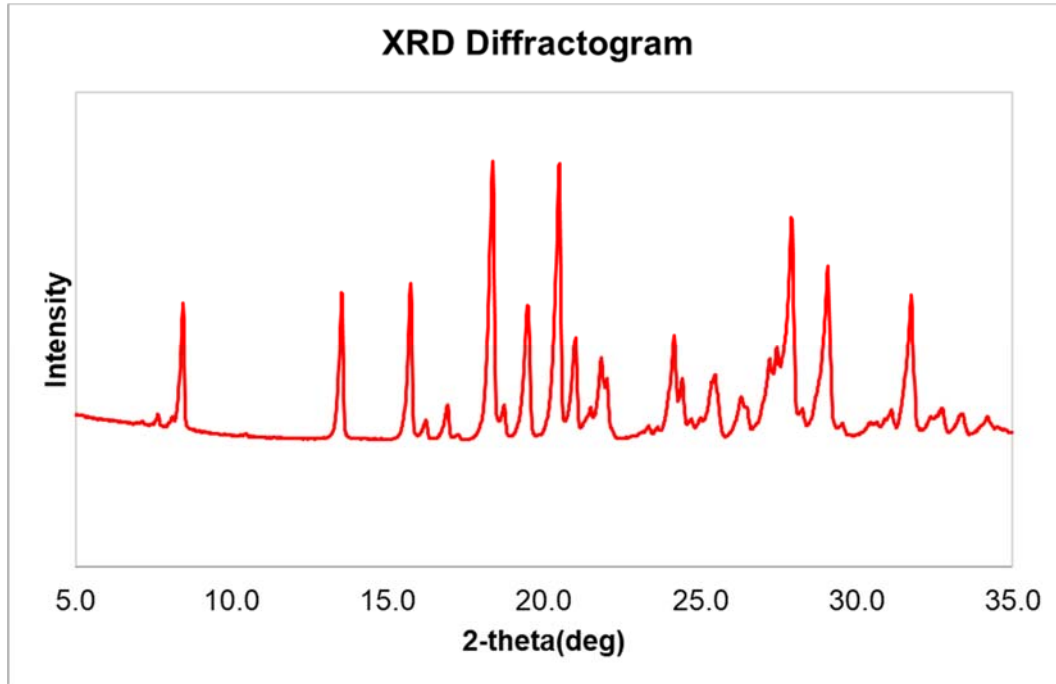
Rufinamitin erime derecesi Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Rufinamit 238°C’de endotermik pik vermiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Rufinamitin erime derecesi tayini

4.1.3. Rufinamitin kristal modifikasyonunun incelenmesi

Rufinamitin kristal modifikasyonu Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. XRD difraktogramı Şekil 4.2’de, difraktograma ait ham veriler Çizelge 4.2’de verilmiştir.



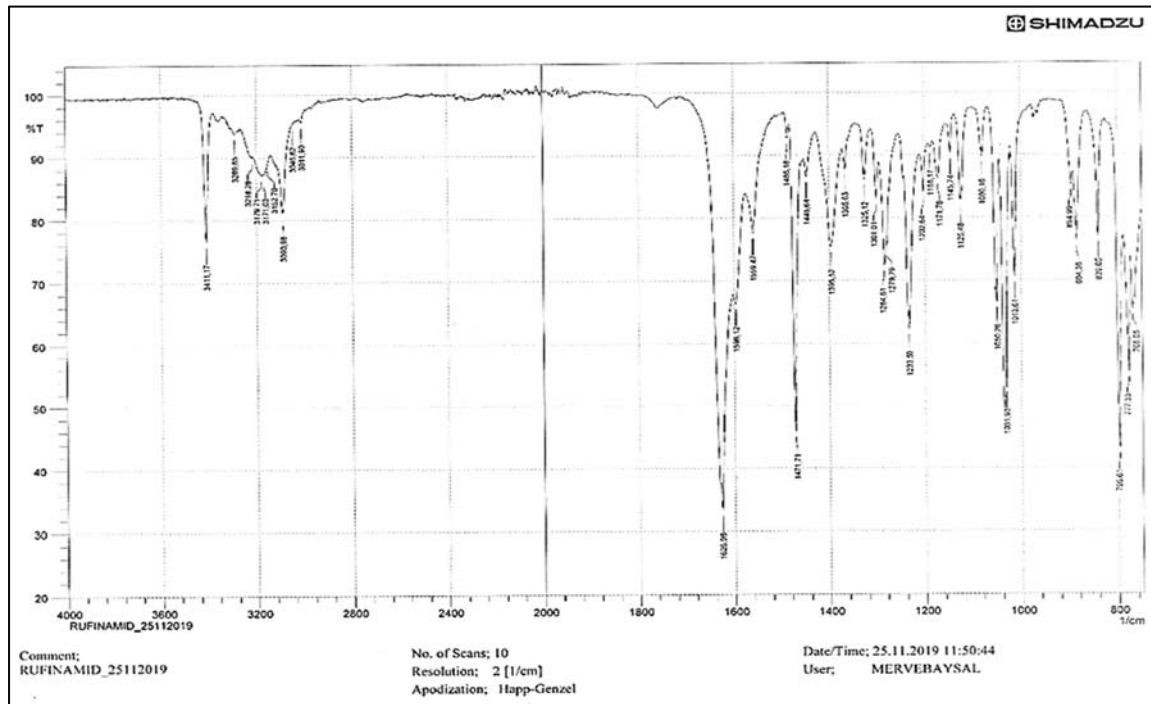
Şekil 4.2. Rufinamitin kristal modifikasyonu

Çizelge 4.2. Rufinamitin kristal modifikasyonu

d (Å°)	Intensity
10,5	Orta
5,14	Orta
4,84	Çok güçlü
4,55	Güçlü
4,34	Orta
4,07	Orta
3,51	Orta
3,48	Orta
3,25	Güçlü
3,19	Orta
3,15	Orta
3,07	Orta
2,81	Orta

4.1.4. Rufinamitin FTIR analizi

Rufinamitin Fourier Dönüşümlü kızılötesi spektrumu Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı şekilde alınmış ve dalga sayısı cm-1 cinsinden değerlendirilmiştir. Rufinamitin FTIR spektrumu Şekil 4.3’te ve yapısında bulunan bağlar Çizelge 4.3’te verilmiştir.



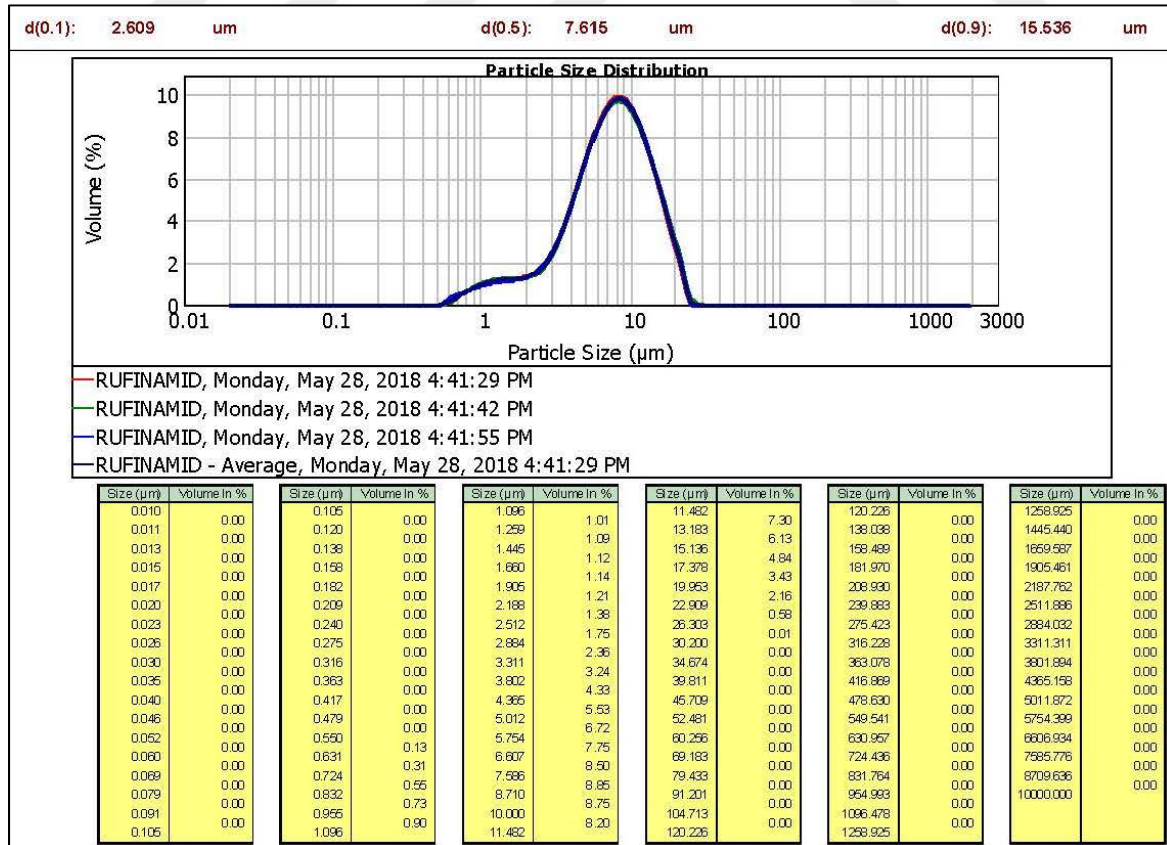
Şekil 4.3. Rufinamitin FTIR spektrumu

Çizelge 4.3. Rufinamitin yapısında bulunan bağlar

Rufinamitin FTIR Spektrumu	Rufinamitin yapısında bulunan bağlar
1396,46 cm^{-1}	N-H bağı
1473,62 cm^{-1}	N-H bağı
1631,78 cm^{-1}	C=O bağı
3095,75 cm^{-1}	=C-H bağı
3184,48 cm^{-1}	=C-H bağı
3412,08 cm^{-1}	N-H bağı

4.1.5. Rufinamitin partikül büyüklüğü dağılımının ölçülmesi

Rufinamitin partikül büyüklüğü dağılımı ölçümü Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Partikül büyüklüğü dağılımı Şekil 4.4’te verilmiştir. Rufinamitin partikül boyutu dağılımı $d(0.1)$: $2.609 \mu\text{m} \pm 0.165$, $d(0.5)$: $7.615 \mu\text{m} \pm 0.183$ ve $d(0.9)$: $15.536 \mu\text{m} \pm 0.539$ olarak bulunmuştur ($n=3 \pm \text{SS}$).



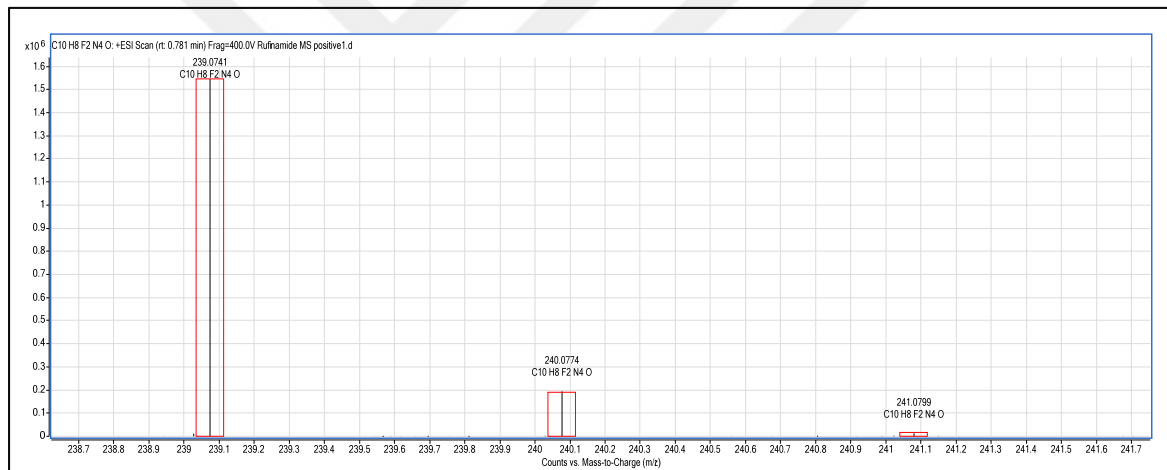
Şekil 4.4. Rufinamitin partikül boyutu dağılımı

4.1.6. Rufinamitin toz akış özelliklerinin belirlenmesi

Rufinamitin toz akış özellikleri Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Rufinamitin küme dansitesi $0,11 \text{ g/mL} \pm 0,01$, sıkıştırılmış dansitesi $0,20 \text{ g/mL} \pm 0,01$, basılabilme indeksi 44 ± 6 , Hausner oranı $1,80 \pm 0,18$ ve yığın açısı $72^\circ \pm 2$ olarak bulunmuştur ($n=3$, Ort. $\pm$ SS).

4.1.7. Rufinamitin kütle spektrumu

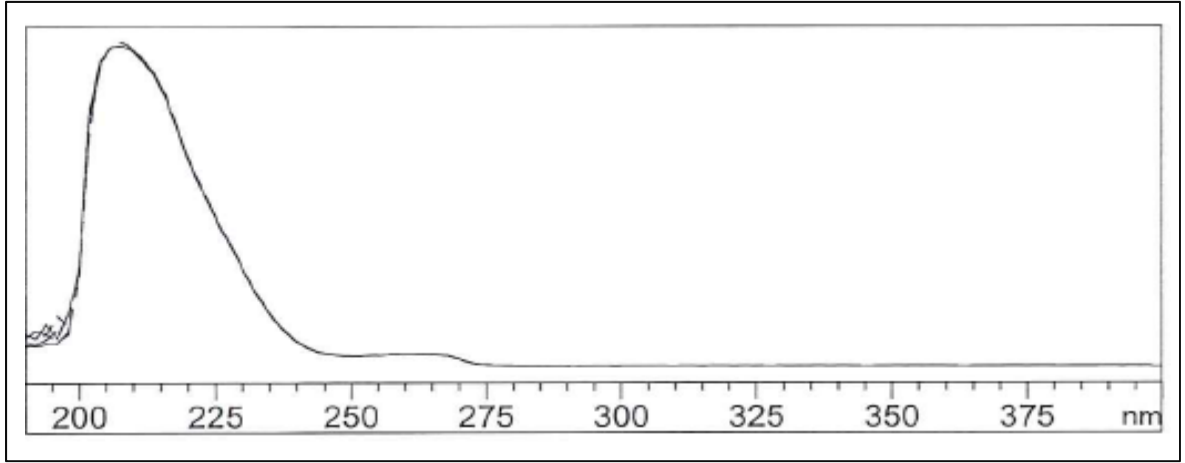
Rufinamitin kütle spektrumu Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı şekilde çekilmiştir. Kütle spektrumu Şekil 4.5’te verilmiştir. Rufinamitin molekül ağırlığı 238 g/mol olarak bulunmuştur.



Şekil 4.5. Rufinamitin kütle spektrumu

4.1.8. Rufinamitin UV spektrumu

Rufinamitin ultraviyole (UV) spektrumu Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı şekilde çekilmiştir. UV spektrumu Şekil 4.6’da verilmiştir. Rufinamitin maksimum absorbans verdiği dalga boyunun 207 nm olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.6. Rufinamitin UV spektrumu

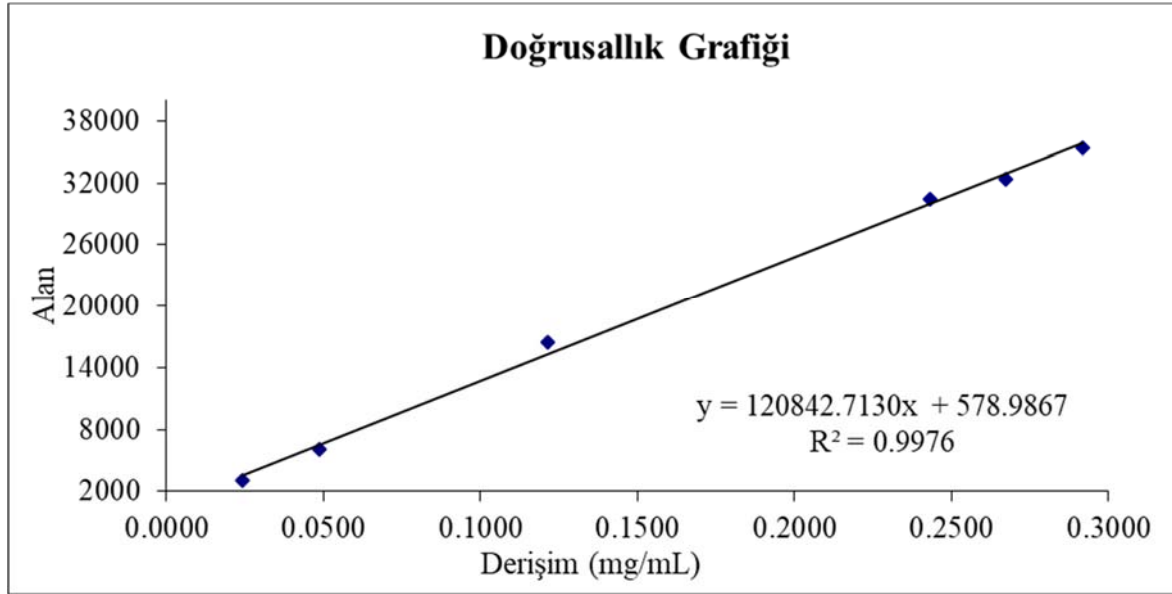
4.2. Rufinamitin Miktar Tayini Yöntemlerinin Geliştirilmesi ve Validasyonu

4.2.1. Miktar tayini yöntemi (Yöntem 1)

Rufinamitin %2 SLS içeren saf su ortamındaki miktar tayinine ait validasyon çalışmaları HPLC aleti kullanılarak Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir.

Doğrusallık ve aralık

Rufinamitin %2 SLS içeren saf su ortamında 0,02-0,29 mg/mL derişim aralığında 6 farklı derişimde numune hazırlanarak HPLC’ye enjekte edilmiş ve doğrusallık parametresi değerlendirilmiştir. Derişimlere karşılık gelen pik alanları bulunmuş ve grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.7’da kalibrasyon doğrusu gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Rufinamitin %2 SLS içeren saf su ortamındaki kalibrasyon doğrusu

İlaveten analitik yöntemin tayin edilen bileşen için doğrusallık, doğruluk ve kesinliğin elde edilebildiği en alt ve en üst derişimler arasındaki aralığın tespit edilmesi için doğrusallık çalışmasının alt ve üst sınır çözeltileri 6'şar kez enjekte edilmiş ve RSD'si hesaplanmıştır. Yapılan çalışmada RSD değerinin en alt seviye olan 0,02 mg/mL derişimi için %1,23, en üst seviye olan 0,29 mg/mL derişimi için %0,83 olduğu, dolayısıyla geliştirilen yöntemin bu derişim aralığında çalışıldığında uygun olduğu bulunmuştur.

Doğruluk ve geri elde

Rufinamitin %2 SLS içeren saf su ortamında hazırlanan %10, %100 ve %120 rufinamit içeren çözeltilerinde kalibrasyon denklemi kullanılarak geri elde miktarları hesaplanmış ve gerekli istatistiksel parametrelerle değerlendirilmiştir. Hesaplanan değerler Çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Rufinamitin %2 SLS içeren saf su ortamındaki doğruluk ve geri elde sonuçları

Seviye	Çözeltideki rufinamit derişimi (mg/mL)	Hesapla bulunan rufinamit derişimi (mg/mL) (Ort ±SS)	% Geri elde	Varyasyon katsayısı
% 10	0,023	0,023±0,001	104	0,815
% 100	0,223	0,229±0,001	103	0,403
% 120	0,267	0,277±0,004	104	1,298

Kesinlik

Deney içi ve deneyler arası kesinlik olmak üzere iki farklı parametre incelenmiştir. Kesinlik ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı ile değerlendirilmiştir.

➤ *Deney içi kesinlik (Tekrar edilebilirlik)*

Rufinamitin %2 SLS içeren saf su ortamındaki stok çözeltisinden 0,22 mg/mL derişimde hazırlanan çözelti arka arkaya 6 kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Elde edilen sonuçların ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır. Çizelge 4.5'de rufinamitin %2 SLS içeren saf su ortamındaki deney içi kesinlik sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Rufinamitin %2 SLS içeren saf su ortamındaki deney içi kesinlik sonuçları

Örnek No	Rufinamit çözeltisinin derişimi (mg/mL)	Hesapla bulunan derişimler (mg/mL)
1	0,22	0,23
2	0,22	0,23
3	0,22	0,23
4	0,22	0,23
5	0,22	0,23
6	0,22	0,23
ORT	-	0,23
Standart sapma	-	0,01
Varyasyon katsayısı	-	0,64

➤ *Deneyler arası kesinlik (Tekrar elde edilebilirlik)*

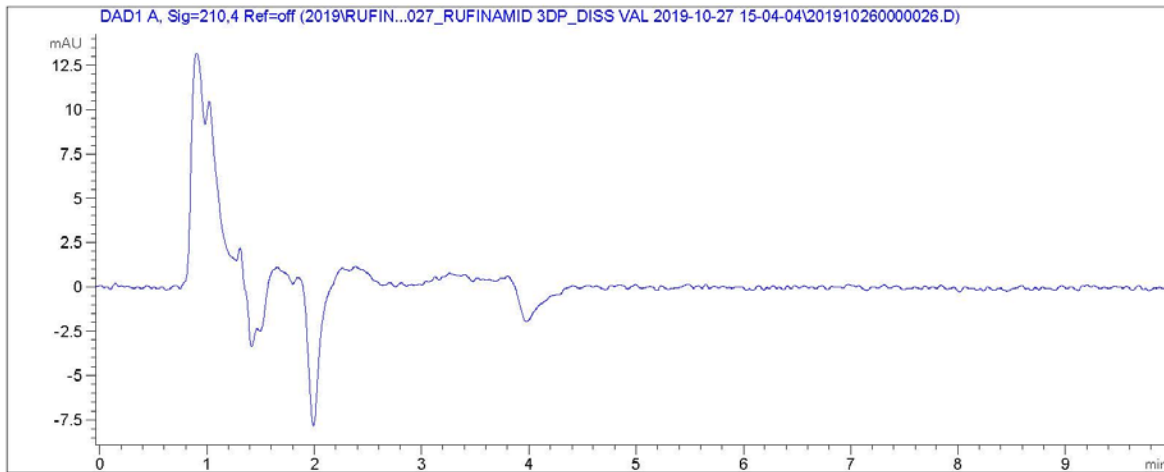
Aynı laboratuvarında farklı bir günde, aynı analist tarafından farklı bir cihaz ile rufinamitin %2 sodyum lauril sülfat içeren saf su çözeltisinde 0,24 mg/mL'lik (% 100) derişimde 6 farklı numune hazırlanıp analiz edilmiştir. Elde edilen pik alanlarına karşılık gelen derişimlerin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır. Deneyler arası kesinliğe ait sonuçlar Çizelge 4.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Rufinamitin %2 SLS içeren saf su ortamındaki deneyler arası kesinlik sonuçları
(Analist: 1, Cihaz: 1) (Analist: 1, Cihaz: 2)

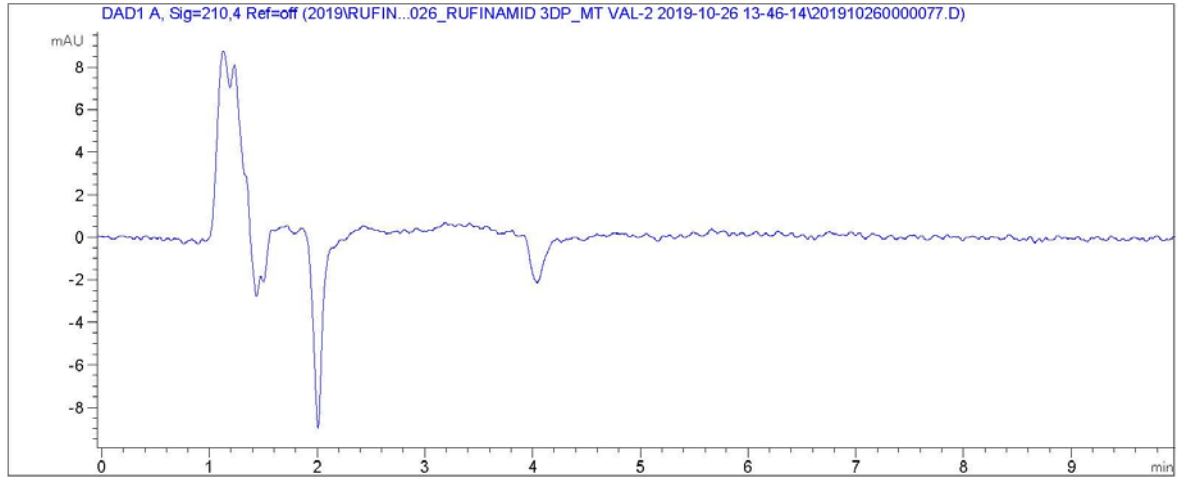
Test Çözelti No	Sonuçlar (%)	
Analist	1	2
1	104	102
2	104	104
3	105	103
4	104	101
5	105	103
6	103	104
Ortalama	104	103
RSD (%)	1	1
Ortalamalar arası fark (%)	1	

Özgünlük ve seçicilik

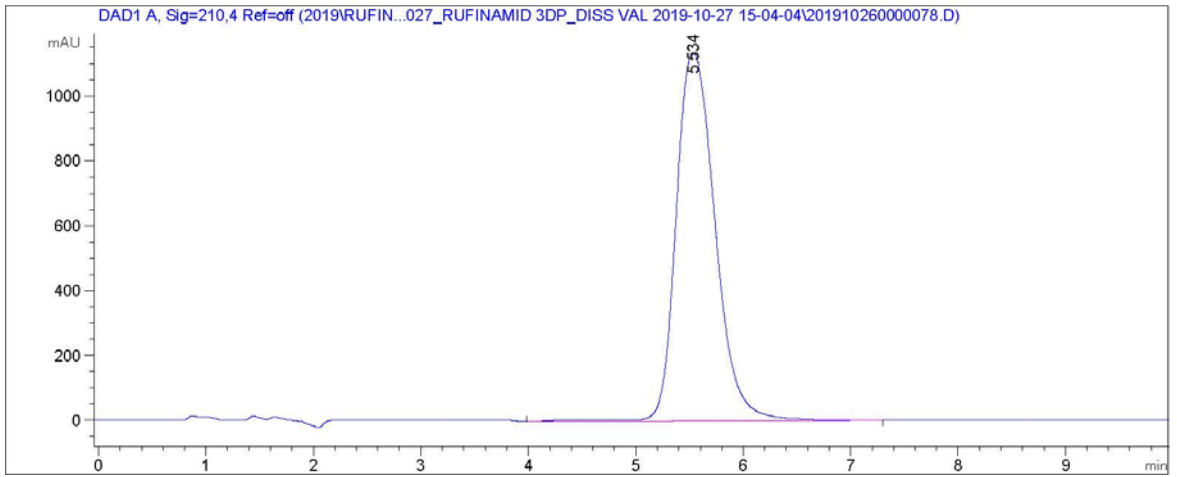
Kullanılan analiz yönteminin sadece analiz etmek istenilen maddeyi saptayabildiğinin, çözücü ve plasebonun aynı dalga boyunda absorbands gösterip göstermediğinin kontrolü yapılmıştır. Çözücü, plasebo, test çözeltisi ve standart çözeltisine ait kromatogramlar Şekil 4.8-Şekil 4.11 arasında gösterilmiştir.



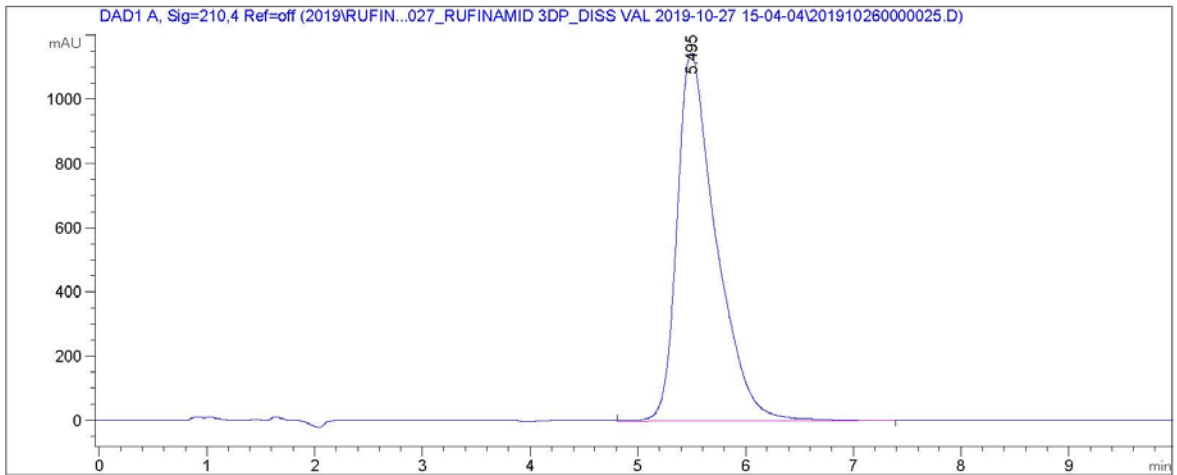
Şekil 4.8. Çözücünün %2 SLS içeren saf su ortamındaki kromatogramı



Şekil 4.9. Plasebonun %2 SLS içeren saf su ortamındaki kromatogramı



Şekil 4.10. Test çözeltisinin %2 SLS içeren saf su ortamındaki kromatogramı



Şekil 4.11. Standart çözeltisinin %2 SLS içeren saf su ortamındaki kromatogramı

Filtre etkisi

Hazırlanan numunelerin HPLC sisteminde tıkanmalara yol açmaması amacıyla gerçekleştirilen filtrasyon çalışmasında kullanılan filtrenin tespiti amacıyla test çözeltisi, standart çözeltisi, çözücü (blank) ve plasebo çözeltileri analitik yöntemdeki gibi hazırlanmış, bu çözeltilerin bir miktarı santrifüj edilmiş ve üst faz farklı filtre tipleri ile süzülerek viallere alınarak analiz edilmiş ve % fark hesaplanmıştır. Tüm filtre tiplerinde blank ve plasebo çözeltilerinde etkin madde piki alıkonma zamanında herhangi bir pik gözlenmemiştir. Test ve standart çözeltilerinde denenen tüm filtrelerde %fark değeri %1'in altında ve uygun bulunmuştur. Filtre tipleri ve %fark değerleri Çizelge 4.7'de sunulmuştur.

Çizelge 4.7. Rufinamitin %2 SLS içeren saf su ortamındaki filtre etkisi sonuçları

	STANDART		TEST	
	ALAN	% Fark	ALAN	% Fark
Filtrelenmemiş	28975,0	-	28922,0	-
F1: Distek Filter Disk 0.45 µm Hidrofilik PVDF	29056,0	0,3	28887,0	0,1
F2: Millipore Millex-HV 0.45 µm Hidrofilik PVDF	28806,0	0,6	28998,0	0,3
F3: Millipore Millex-FH 0.45 µm Hidrofobik PTFE	28977,0	0,1	29016,0	0,3

Teşhis ve tayin sınırı (LOD ve LOQ)

Geliştirilen analitik yöntemin teşhis sınırı ve tayin sınırı hesaplanmıştır. Analitik yöntemin LOD değeri 0.0010 mg/mL, LOQ değeri 0.0031 mg/mL olarak bulunmuştur.

Yöntem sağlamlığı

Çözünme analizleri formülasyon gelişimi çalışmasında yol gösteren çok önemli analizlerdir. Sağlam bir yöntem ile analizlerin gerçekleştirilmesi, yapılan formülasyon gelişimi çalışmalarını daha doğru değerlendirilmesine ve yönlendirilmesine imkân sağlar. Bu nedenle validasyon çalışmasının sağlamlık parametresinde istatistiksel merkezi tekrarlı (CCD, central composite design) deney tasarımı kullanılarak yöntem aydınlatılmıştır. Yöntem parametrelerinde istatistiksel merkezi tekrarlı (CCD, central composite design) deney

tasarımı kullanılarak Bölüm 3.2.2’de belirtilen değişiklikler yapılmış ve yapılan bu değişikliklerin sistem uygunluk parametreleri ve test sonuçları üzerinde etkisi istatistiksel sonuçlar ve çoklu değişkenler için geliştirilmiş tasarım alanı (design space, MODR) üzerinden incelenmiştir. Tasarım alanı gelişiminde optimizasyon cevapları (ATP) olarak etkin madde alıkonma zamanları, alan değerleri, kuyruklanma faktörü ve teorik plaka sayısı belirlenmiştir. Deney tasarımı sonuçları Çizelge 4.8’de, ANOVA analizi sonuçları Çizelge 4.9’da, istatistiksel olarak geliştirilen matematiksel eşitlikler ve tasarım alanı geliştirmek için belirlenen optimizasyon limitleri Çizelge 4.10’da ve geliştirilen tasarım sahaları Şekil 4.12’de sunulmuştur. Şekil 4.12’de bulunan sarı bölgeler sistem uygunluk kriterlerinin karşılandığı tasarım alanı oluşturmaktadır.

Çizelge 4.8. Deney tasarımı çalışmaları sonuçları

RUN	FAKTÖRLER			CEVAPLAR					
	A	B	C	STANDART			TEST		
				ALAN	Simetri Faktörü	Plaka Sayısı	ALAN	Simetri Faktörü	Plaka Sayısı
1	25	3	1,00	28799	0,76	1246	29044	0,77	1248
2	22	4	1,06	27243	0,67	1084	27289	0,68	1088
3	28	4	0,94	30553	0,76	1242	30885	0,79	1255
4	28	4	1,06	27017	0,76	1203	27139	0,79	1201
5	22	4	0,94	30527	0,82	1249	30831	0,83	1253
6	25	5	0,90	31979	0,86	1309	32292	0,87	1269
7	25	5	1,00	28831	0,86	1207	28883	0,85	1205
8	25	5	1,00	28918	0,86	1208	29033	0,88	1221
9	25	5	1,10	25979	0,84	1116	26389	0,85	1134
10	25	5	1,00	28603	0,87	1229	28979	0,9	1244
11	25	5	1,00	28922	0,89	1245	29027	0,89	1260
12	30	5	1,00	28764	0,92	1327	28821	0,93	1327
13	25	5	1,00	29094	0,91	1270	29035	0,93	1265
14	20	5	1,00	29133	0,91	1183	29287	0,93	1181
15	25	7	1,00	27857	1,05	1136	28599	0,83	1050
16	22	6	1,06	26917	1,00	1039	27399	0,89	951
17	22	6	0,94	30316	1,11	1301	30847	0,94	1036
18	28	6	1,06	26905	1,04	1282	27164	0,91	1211
19	28	6	0,94	31264	1,04	1441	30088	1,00	1288
20	25	3	1,00	28799	0,76	1246	29044	0,77	1248

Çizelge 4.9. İstatistiksel deney tasarımı ANOVA sonuçları ((a) standart çözelti, (b) test çözelti)

(A) Standart Çözelti						
Cevaplar	Hata Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F Değeri	Prob > F*
Alan	Model	4,473E+007	3	1,491E+007	135,89	< 0,0001*
	A : Kolon Sıcaklığı	975,44	1	975,44	8,890E-003	0,9261
	B : MF THF Oranı	1,697E+005	1	1,697E+005	1,55	0,2327
	C : MF Akış hızı	4,456E+007	1	4,456E+007	406,12	< 0,0001*
	Residual (Kalıntı)	1,646E+006	15	1,097E+005		
	Lack of fit (Uyum eksikliği)	1,518E+006	11	1,380E+005	4,31	0,0853
	Pure Error (Hata)	1,279E+005	4	31982,30		
	Total (Genel Toplam)	4,638E+007	18			
	R²	0,9645				
Simetri Faktörü	Model	0,21	3	0,070	32,42	< 0,0001*
	A : Kolon Sıcaklığı	2,071E-005	1	2,071E-005	9,591E-003	0,9233
	B : MF THF Oranı	0,20	1	0,20	94,32	< 0,0001*
	C : MF Akış hızı	6,313E-003	1	6,313E-003	2,92	0,1079
	Residual (Kalıntı)	0,032	15	2,159E-003		
	Lack of fit (Uyum eksikliği)	0,031	11	2,774E-003	5,90	0,0505
	Pure Error (Hata)	1,880E-003	4	4,700E-004		
	Total (Genel Toplam)	0,24	18			
	R²	0,8664				
Plaka Sayısı	Model	1,282E+005	6	21361,99	9,95	0,0005*
	A : Kolon Sıcaklığı	39791,86	1	39791,86	18,53	0,0010*
	B : MF THF Oranı	732,27	1	732,27	0,34	0,5700
	C : MF Akış hızı	66026,45	1	66026,45	30,75	0,0001*
	AB	9180,13	1	9180,13	4,28	0,0609
	AC	6555,12	1	6555,12	3,05	0,1061
	BC	5886,13	1	5886,13	2,74	0,1237
	Residual (Kalıntı)	25763,20	12	2146,93		
	Lack of fit (Uyum eksikliği)	22940,40	8	2867,55	4,06	0,0958
	Pure Error (Hata)	2822,80	4	705,70		
	Total (Genel Toplam)	1,539E+005	18			
	R²	0,8326				

*"Prob > F" değerleri 0,05'ten küçük olan terimler anlamlı olarak kabul edilmiştir. "Model" terimi Prob > F değeri 0,05'ten küçük ve "Lack of fit" terimi için Prob > F değeri 0,05'ten büyük olan modeller tasarım alanında kullanılmıştır.

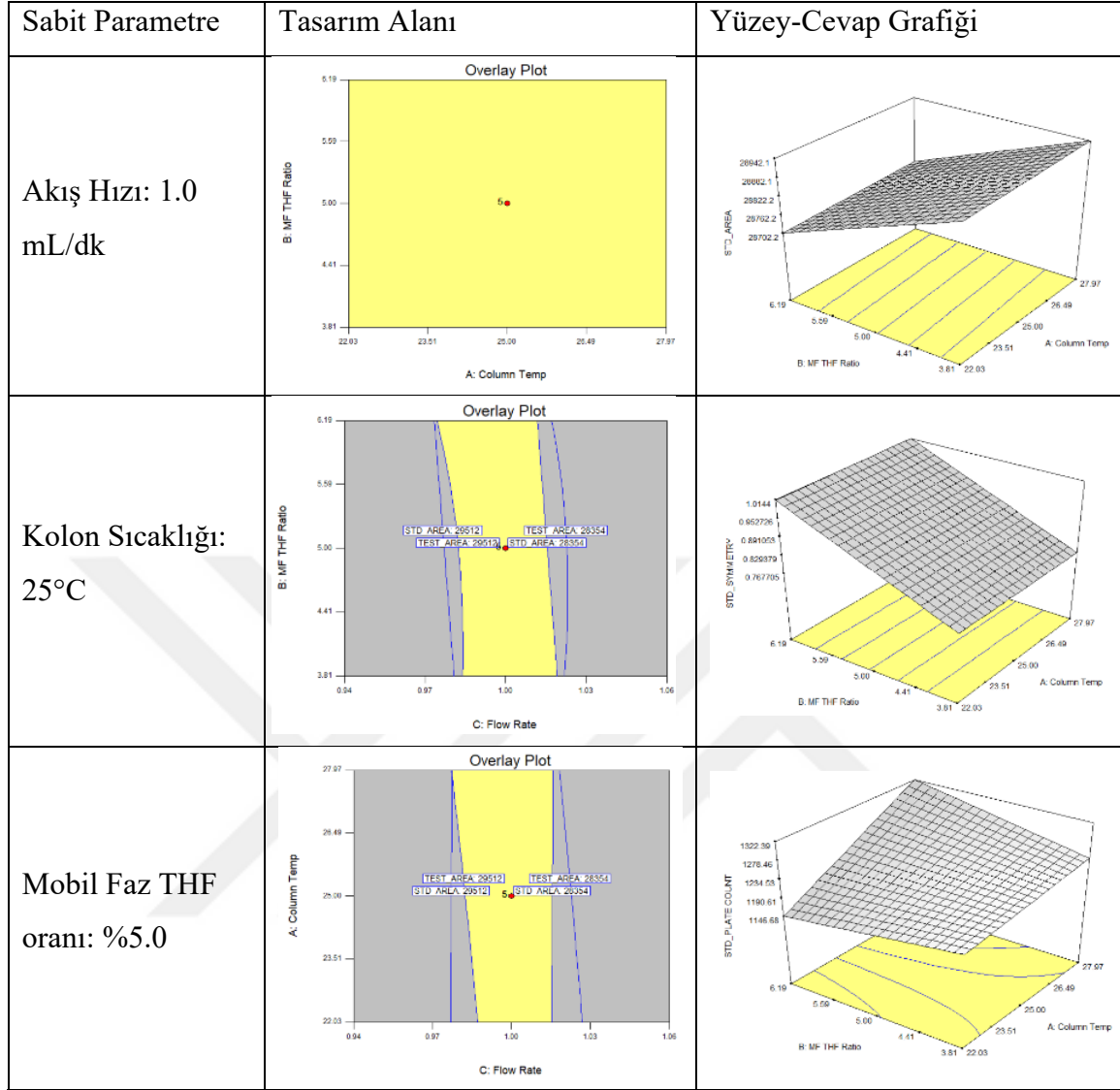
Çizelge 4.9. (devam) İstatistiksel deney tasarımı ANOVA sonuçları ((a) standart çözelti, (b) test çözelti)

(B) Test Çözelti						
Cevaplar	Hata Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F Değeri	Prob > F*
Alan	Model	4,163E+007	9	4,625E+006	284,00	< 0,0001*
	A : Kolon Sıcaklığı	2,571E+005	1	2,571E+005	15,78	0,0032*
	B : MF THF Oranı	1,424E+005	1	1,424E+005	8,74	0,0160*
	C : MF Akış hızı	4,074E+007	1	4,074E+007	2501,44	< 0,0001*
	A²	197,52	1	197,52	0,012	0,9147
	B²	1,010E+005	1	1,010E+005	6,20	0,0344*
	C²	1,297E+005	1	1,297E+005	7,97	0,0200*
	AB	1,008E+005	1	1,008E+005	6,19	0,0345*
	AC	12800,00	1	12800,00	0,79	0,3984
	BC	1,049E+005	1	1,049E+005	6,44	0,0318*
	Residual (Kalıntı)	1,466E+005	9	16286,49		
	Lack of fit (Uyum eksikliği)	1,298E+005	5	25955,03	6,18	0,0510
	Pure Error (Hata)	16803,20	4	4200,80		
	Total (Genel Toplam)	4,177E+007	18			
	R²	0,9965				
Simetri Faktörü	Model	0,051	3	0,017	5,27	0,0111*
	A : Kolon Sıcaklığı	1,648E-003	1	1,648E-003	0,51	0,4842
	B : MF THF Oranı	0,041	1	0,041	12,89	0,0027*
	C : MF Akış hızı	7,669E-003	1	7,669E-003	2,39	0,1426
	Residual (Kalıntı)	0,048	15	3,202E-003		
	Lack of fit (Uyum eksikliği)	0,045	11	4,058E-003	4,77	0,0722
	Pure Error (Hata)	3,400E-003	4	8,500E-004		
	Total (Genel Toplam)	0,099	18			
	R²	0,5130				
Plaka Sayısı	Model	1,608E+005	9	17864,23	11,22	0,0007*
	A : Kolon Sıcaklığı	55747,03	1	55747,03	35,01	0,0002*
	B : MF THF Oranı	30367,87	1	30367,87	19,07	0,0018*
	C : MF Akış hızı	27071,76	1	27071,76	17,00	0,0026*
	A²	121,26	1	121,26	0,076	0,7888
	B²	21953,62	1	21953,62	13,79	0,0048*
	C²	6334,51	1	6334,51	3,98	0,0772
	AB	19701,13	1	19701,13	12,37	0,0065*
	AC	1770,12	1	1770,12	1,11	0,3192
	BC	406,12	1	406,12	0,26	0,6257
	Residual (Kalıntı)	14328,88	9	1592,10		
	Lack of fit (Uyum eksikliği)	11706,88	5	2341,38	3,57	0,1206
	Pure Error (Hata)	2622,00	4	655,50		
	Total (Genel Toplam)	1,751E+005	18			
	R²	0,9182				

*"Prob > F" değerleri 0,05'ten küçük olan terimler anlamlı olarak kabul edilmiştir. "Model" terimi Prob > F değeri 0,05'ten küçük ve "Lack of fit" terimi için Prob > F değeri 0,05'ten büyük olan modeller tasarım alanında kullanılıştır.

Çizelge 4.10. İstatistiksel olarak geliştirilmiş matematiksel eşitlikler ve tasarım alanı geliştirmek için belirlenen optimizasyon limitleri

Cevap	MATEMATİKSEL EŞİTLİKLER	NORMAL YÖNTEM KOŞULLARI (MF THF Oranı:% 5.0, Akış: 1.0 mL/dk, Kolon sıc. 25°C)
ALAN	$= +59598,43309 - 30378,69327 * \text{Akış hızı}$	28354 – 29512 (28933 $\pm$ % 2)
Simetri faktörü	$= +0,72886 + 0,10269 * \text{MF THF Oranı}$	< 2,0
Plaka sayısı	$= +5239,72132 - 191,67777 * \text{Kolon Sıc.} - 3299,54045 * \text{Akış hızı}$	> 1000



Şekil 4.12. Tasarım alanı ve Yüzey cevap grafikleri

- Geliştirilen istatistiksel tasarım alanı içerisinde tüm sistem uygunluk kriterleri karşılanmaktadır ve analitik metod bu tasarım alanı içinde sağlamdır.
- Tasarım alanını oluşturan tüm modellerin anlamlı olduğu ve hataların (lack of fit) anlamsız olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Bu nedenle cevaplar için oluşturulan matematiksel kestirimler teknoloji transferi gibi çalışmalarda kullanılabilir.
- İstatistiksel değerlendirme aşağıdaki gibidir: ($p < 0,05$)
 - o *ALAN* üzerinde en etkili faktör *Akış hızıdır*. Akış hızında artış, alanda düşmeye neden olmaktadır.
 - o *Simetri faktörü (Symmetry factor)* üzerinde en etkili faktör *MF THF oranıdır*. Oran arttıkça simetri faktörü artmaktadır.

- o *Plaka sayısı (Plate count)* üzerinde tüm faktörler etkilidir. Plaka sayısının yüksek seviyede olması, analizin daha sağlam olduğunu göstermektedir.

Çözelti ve hareketli faz stabilitesi

Bu amaçla rufinamitin %2 Sodyum lauril sülfat içeren saf su çözeltisinde 0,24 mg/mL'lik (% 100) derişimdeki test ve standart çözeltileri stabilite çalışmalarında kullanılmıştır. Çözeltiler 25°C sıcaklıkta 5, 10 ve 15 saat sürelerde bekletilmiş ve miktar tayini Yöntem 1'e göre HPLC ile tayin edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.11'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar, test ve standart çözeltilerinin en az 15 saat stabil olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.11. Standart ve Test çözeltisi stabilite sonuçları

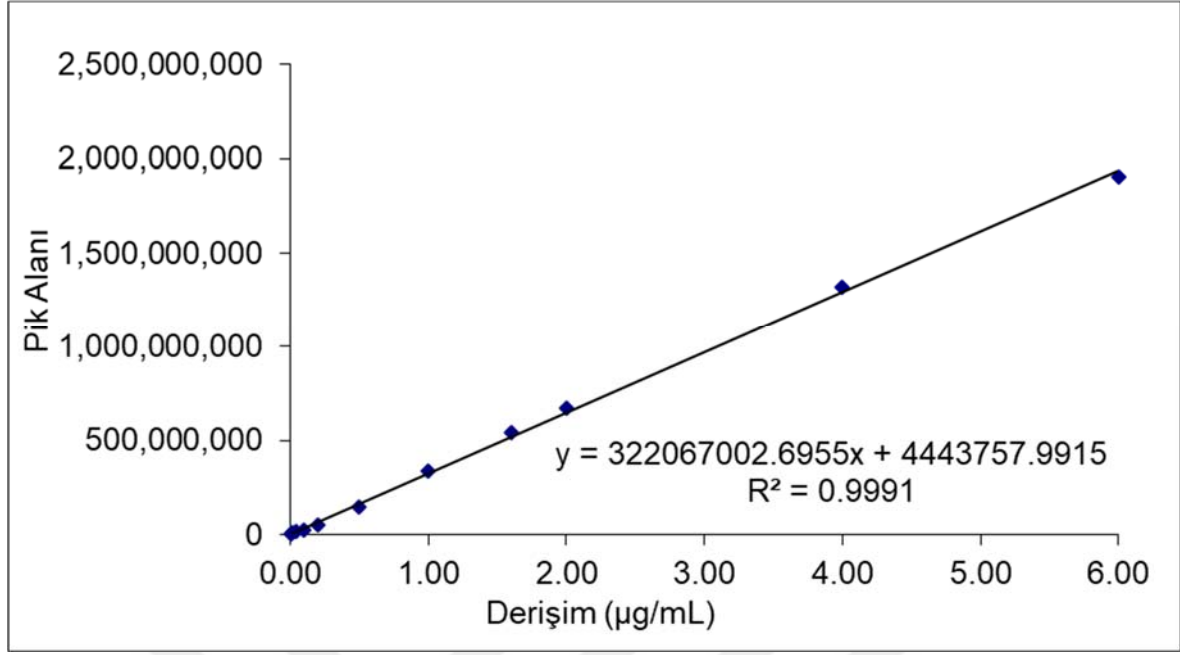
SÜRE (saat)	STANDART ÇÖZELTİSİ				TEST ÇÖZELTİSİ				
	RT	ALAN	% MİKTAR TAYİNİ	% BAĞIL HATA	Süre (saat)	RT	ALAN	% MİKTAR TAYİNİ	% BAĞIL HATA
0	5,49	28848	100,00	-	0	5,62	28796	100,00	-
5	5,49	28583	99,08	0,92	5	5,49	28743	99,82	0,18
13	5,52	28563	99,01	0,99	13	5,52	28681	99,60	0,40
15	5,53	28526	98,88	1,12	15	5,53	28647	99,48	0,52

4.2.2. Miktar tayini yöntemi (Yöntem 2)

Rufinamitin in-vivo deneylerde kullanılmak üzere geliştirilen miktar tayini validasyon çalışmaları UPLC-MS aleti kullanılarak Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir.

Doğrusallık

Rufinamitin sıçan plazmasında 0,015 µg/mL-6 µg/mL derişim aralığında 10 farklı numune hazırlanarak doğrusallık parametresi değerlendirilmiştir. Üç ayrı seri çözeltisi hazırlanmış ve UPLC-MS sistemine enjekte edilmiştir. Derişimlere karşılık gelen pik alanları bulunmuş ve grafiğe geçirilmiştir. En küçük kareler yöntemine göre değerlendirilmiş, standart doğru denklemi bulunmuş ve doğrusallığı kanıtlanmıştır. Şekil 4.13'te kalibrasyon doğrusuna ait grafik gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Rufinamitin sıçan plazmasındaki kalibrasyon doğrusu

Doğruluk ve ekstraksiyon etkinliği (Geri elde)

Sıçan plazması içerisinde hazırlanan 0.040 µg/mL (LLOQ), 1 µg/mL ve 2 µg/mL rufinamit içeren çözeltilerden kalibrasyon denklemi kullanılarak ekstraksiyon etkinliği hesaplanmış ve gerekli istatistiksel parametrelerle değerlendirilmiştir. Hesaplanan değerler Çizelge 4.12’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.12. Rufinamitin plazma içindeki çözeltilerden ekstraksiyon etkinliği

Çözeltideki rufinamit derişimi (µg/mL)	Hesapla bulunan rufinamit derişimi (µg/mL) (Ort ± SS)	% Ekstraksiyon etkinliği	Varyasyon katsayısı
0,040	0,040 ± 0,001	%101	1,29
1,000	1,035 ± 0,011	%103	1,04
2,000	2,047 ± 0,009	%102	0,45

Kesinlik

Deney içi ve deneyler arası kesinlik olmak üzere iki farklı parametre incelenmiştir. Kesinlik ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri ile değerlendirilmiştir.

➤ Deney içi kesinlik (Tekrar edilebilirlik)

Rufinamitin plazma içerisindeki stok çözeltisinden 0,04 µg/mL, 1 µg/mL ve 2 µg/mL derişimlerinde hazırlanan çözeltiler arka arkaya 6 kez UPLC-MS sistemine enjekte edilmiştir. Elde edilen sonuçların ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır. Çizelge 4.13’de rufinamitin plazma içindeki deney içi kesinlik sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 4.13. Rufinamitin plazma içindeki deney içi kesinlik sonuçları

Çözeltilerdeki rufinamit derişimi (µg/mL)	Numune No	Hesapla bulunan rufinamit derişimi (µg/mL)	Hesapla bulunan ortalama rufinamit derişimi (µg/mL) (Ort ± SS)
0.04 µg/mL (LLOQ)	1	0,041	0,039 ± 0,002
	2	0,041	
	3	0,040	
	4	0,040	
	5	0,036	
	6	0,038	
1 µg/mL	1	1,022	1,040 ± 0,009
	2	1,042	
	3	1,040	
	4	1,045	
	5	1,049	
	6	1,042	
2 µg/mL	1	2,039	2,065 ± 0,024
	2	2,057	
	3	2,045	
	4	2,061	
	5	2,092	
	6	2,098	

➤ *Deneyler arası kesinlik (Tekrar elde edilebilirlik)*

Rufinamitin plazma içerisinde 0,04 µg/mL, 1 µg/mL ve 2 µg/mL derişimlerinde çözeltileri hazırlanmıştır. Bu numuneler birbirini takip eden 2 gün içerisinde 6'şar kez UPLC-MS sistemine enjekte edilmiştir. Elde edilen pik alanlarına karşılık gelen derişimlerin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır. Deneyler arası kesinliğe ait sonuçlar Çizelge 4.14'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.14. Rufinamitin plazma içindeki deneyler arası kesinlik sonuçları

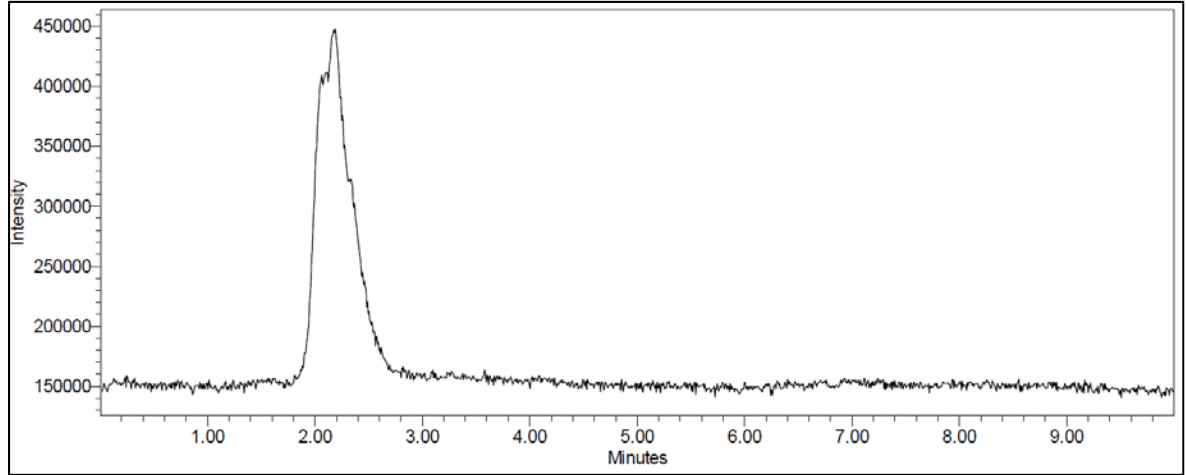
Çözeltildeki rufinamit derişimi (µg/mL)	Numune No	Hesapla bulunan rufinamit derişimi (µg/mL)	Hesapla bulunan ort. rufinamit derişimi (µg/mL) (Ort ± SS)	Varyasyon katsayısı	Hesapla bulunan ort. rufinamit derişimleri arasındaki fark (µg/mL)
0.04 µg/mL (LLOQ)	1.Gün-1	0,041	0,039±0,002	0,002	0,004
	1.Gün-2	0,041			
	1.Gün-3	0,040			
	1.Gün-4	0,040			
	1.Gün-5	0,036			
	1.Gün-6	0,038			
	2.Gün-1	0,042	0,043±0,002	5,367	
	2.Gün-2	0,042			
	2.Gün-3	0,042			
	2.Gün-4	0,047			
	2.Gün-5	0,041			
	2.Gün-6	0,044			
1 µg/mL	1.Gün-1	1,022	1,040±0,009	0,895	0,020
	1.Gün-2	1,042			
	1.Gün-3	1,040			
	1.Gün-4	1,045			
	1.Gün-5	1,049			
	1.Gün-6	1,042			
	2.Gün-1	1,042	1,060±0,013	1,251	
	2.Gün-2	1,047			
	2.Gün-3	1,065			
	2.Gün-4	1,064			
	2.Gün-5	1,078			
	2.Gün-6	1,066			

Çizelge 4.14. (devam) Rufinamitin plazma içindeki deneyler arası kesinlik sonuçları

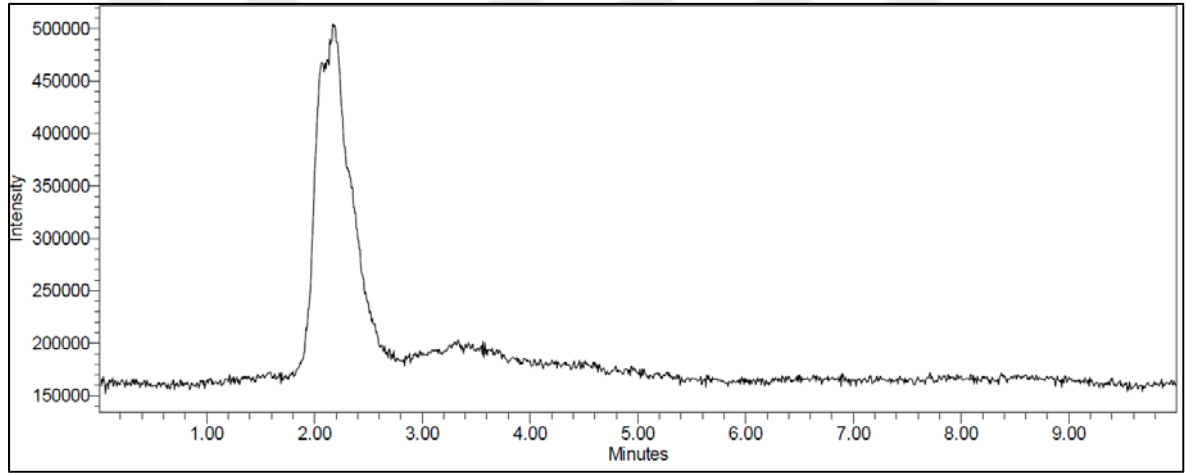
Çözeltildeki rufinamit derişimi (µg/mL)	Numune No	Hesapla bulunan rufinamit derişimi (µg/mL)	Hesapla bulunan ort. rufinamit derişimi (µg/mL) (Ort ± SS)	Varyasyon katsayısı	Hesapla bulunan ort. rufinamit derişimleri arasındaki Fark (µg/mL)
2 µg/mL	1.Gün-1	2,039	2,065±0,024	1,180	0,038
	1.Gün-2	2,057			
	1.Gün-3	2,045			
	1.Gün-4	2,061			
	1.Gün-5	2,092			
	1.Gün-6	2,098			
	2.Gün-1	2,077	2.027±0.033	1.648	
	2.Gün-2	2,027			
	2.Gün-3	2,008			
	2.Gün-4	2,050			
	2.Gün-5	2,018			
	2.Gün-6	1,981			

Özgünlük ve seçicilik

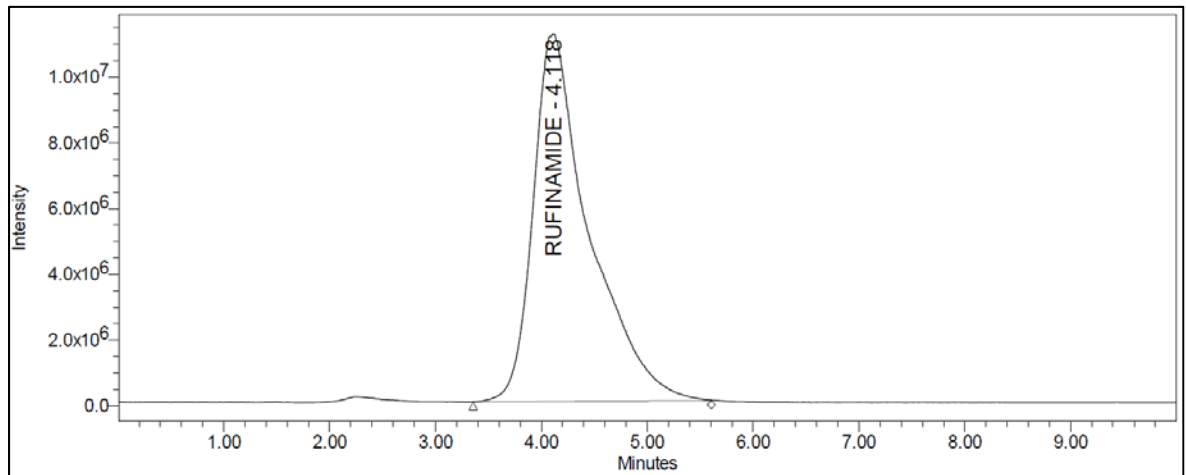
Kullanılan analiz yönteminin sadece analiz etmek istenilen maddeyi saptaması gerekmektedir. Numune içinde var olan diğer maddelerin aynı dalga boyunda saptanıp saptanmadığının kontrolü yapılmıştır. Bu amaçla blank plazma, mobil faz ve etkin madde içeren standart çözeltileri UPLC-MS sistemine enjekte edilmiş ve elde edilen kromatogramlar sırasıyla Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16’da gösterilmiştir.



Şekil 4.14. Blank plazmaya ait kromatogram



Şekil 4.15. Mobil faza ait kromatogram



Şekil 4.16. Standart çözeltiye ait kromatogram

Teşhis ve tayin sınırı

Analitik yöntemin LOD değeri 0,015 µg/mL, LLOQ değeri 0,040 µg/mL olarak bulunmuştur.

Plazma örneklerinin stabilitesi

Rufinamitin plazma içerisindeki stabilitesi otomatik örnekleyici stabilitesi ve dondurma-çözdürme stabilitesi olmak üzere Bölüm 3.2.2’de belirtildiği şekilde iki ayrı şekilde incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar sırasıyla Çizelge 4.15 ve Çizelge 4.16’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.15. Rufinamitin otomatik örnekleyici stabilitesi

	Derişim: 0,04 µg/mL			Derişim: 1µg/mL			Derişim: 2µg/mL		
SÜRE (Saat)	RT	% MİKTAR TAYİNİ	% BAĞIL HATA	RT	% MİKTAR TAYİNİ	% BAĞIL HATA	RT	% MİKTAR TAYİNİ	% BAĞIL HATA
0	4,05	100,0	-	4,04	100,0	-	4,03	100,0	-
12	4,03	98,8	1,2	4,02	98,2	1,8	4,01	101,3	-1,3
24	4,06	99,5	0,5	4,05	98,5	1,5	4,05	101,0	-1,0
96	4,01	99,7	0,4	4,00	98,4	1,6	3,99	101,3	-1,4

Çizelge 4.16. Rufinamitin dondurma-çözme stabilitesi

	Derişim: 0,04 µg/mL			Derişim: 1µg/mL			Derişim: 2µg/mL		
DÖNGÜ	RT	% MİKTAR TAYİNİ	% BAĞIL HATA	RT	% MİKTAR TAYİNİ	% BAĞIL HATA	RT	% MİKTAR TAYİNİ	% BAĞIL HATA
0	4,15	100,0	-	4,15	100,0	-	4,11	100,0	-
1	4,02	99,1	0,9	4,03	98,5	1,5	4,04	98,6	1,4
2	4,05	99,4	0,6	4,04	98,6	1,4	4,09	100,9	-0,9
3	4,00	98,2	1,8	4,04	98,4	1,6	4,02	100,9	-0,9

4.3. Referans Ürün Karakterizasyonu

Referans ürün olan Inovelon® Film Tablet (Eisai, Japonya) için kalitatif ve kantitatif içerik bilgisi Çizelge 4.17’de, fizikokimyasal karakterizasyonu Çizelge 4.18’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.17. Referans ürün olan Inovelon® Film Tablet (Eisai, Japonya) için kalitatif ve kantitatif özellikler (Portman, Hoffmeier, Burkhard, Sherrer ve Szlagiewicz, 2004)

	mg	mg	mg
Çekirdek Tablet			
Rufinamit	100,00	200,00	400,00
Kolloidal silikon dioksit	0,88	1,75	3,50
Mikrokristalin selüloz	36,62	73,25	146,50
Hidroksipropil metilselüloz	5,00	10,00	20,00
Laktoz	20,00	40,00	80,00
Magnezyum stearat	2,00	4,00	8,00
Mısır nişastası	10,00	20,00	40,00
Sodyum karboksimetil selüloz	5,00	10,00	20,00
Sodyum lauril sülfat	0,50	1,00	2,00
Film Kaplama			
Hidroksipropil metilselüloz	3,22	6,43	12,87
Kırmızı demiroksit	0,04	0,09	0,18
Polietilen glikol 8000	0,58	1,16	2,32
Talk	2,33	4,66	9,31
Titanyum dioksit	0,83	1,66	3,32
TOPLAM	187,00	364,00	748,00

Çizelge 4.18. Referans ürün olan Inovelon® Film Tablet (Eisai, Japonya) için fizikokimyasal özellikler

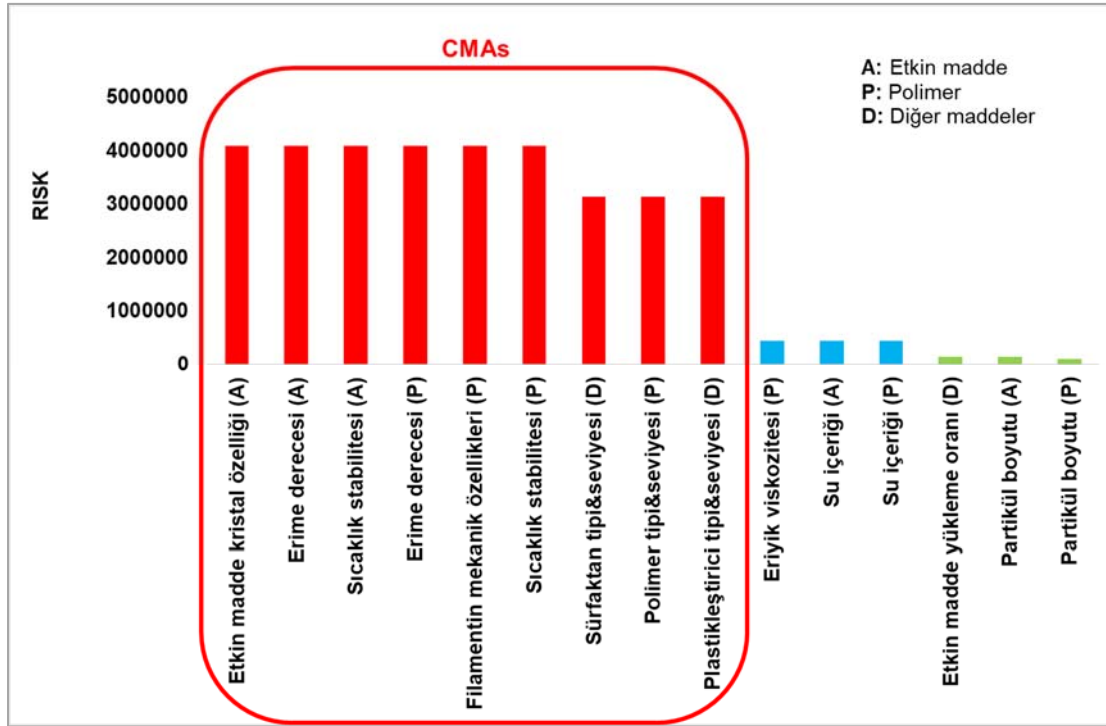
Fizikokimyasal özellikler	Sonuç
Görünüş	Pembe, ovaloid', hafif konveks, iki tarafı çentikli, bir tarafında 'C262' yazılı, diğer tarafı yazısız film tablet
Sertlik	16 kp
Ortalama Tablet Ağırlığı	374,5 mg
Kalınlık	4,57 mm
Su Miktarı (KF)	%2,73
Miktar Tayini	195,8 mg (%97,9)
İlgili bileşikler	Herhangi bilinmeyen impürite: %0,07 Toplam impürite: %0,07
Çözünme (Q(30,dk))	% 77

Kalite hedefli ürün profili (QTPP) ve kritik kalite özelliklerinin (CQAs) risk analizi için oluşturulan “sebe-sonuç matrisi” Çizelge 4.19’da gösterilmiştir.

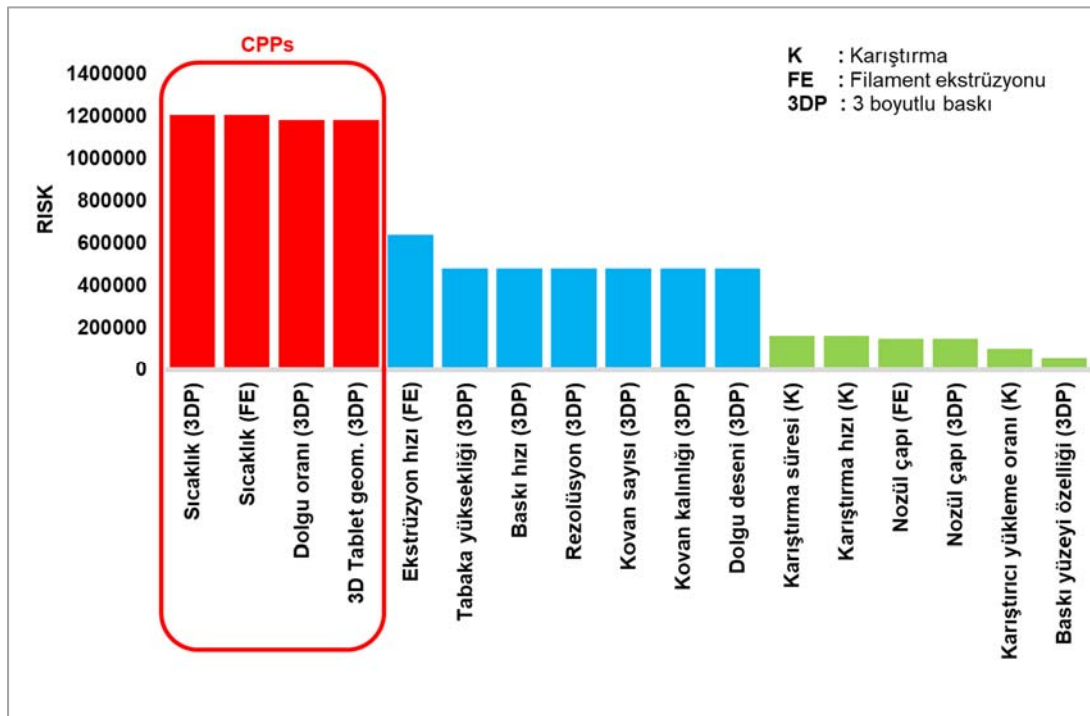
Çizelge 4.19. QTPP ve CQA tespiti için oluşturulan sebe-sonuç matrisi (Yüksek riskli özellikler için kritik kalite özellikleridir (CQAs), Orta riskli özellikler “kontrol altında tutulması gereken” kalite özellikleridir. Düşük riskli özellikler için herhangi bir çalışma yapılmasına gerek bulunmamaktadır.)

QTPP/ CQAs	İlaç Şekli	Kullanım Yolu	Yitilik	Farmakokinetik	Stabilite
Görünüş	Orta	Orta	Düşük	Düşük	Düşük
Miktar tayini	Düşük	Düşük	Düşük	Yüksek	Yüksek
Çözünme	Orta	Düşük	Yüksek	Yüksek	Yüksek
Su içeriği	Düşük	Düşük	Düşük	Düşük	Yüksek
Kristal özellikler	Orta	Orta	Orta	Yüksek	Yüksek

Kritik materyal özellikleri (CMAs) ve kritik proses parametrelerinin (CPPs) değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilen “Lean QbD®” risk analizi sonuçları, sırasıyla Şekil 4.18 ve Şekil 4.19’da sunulmuştur.



Şekil 4.18. Kritik materyal özelliklerinin (CMAs) tespiti amacıyla gerçekleştirilen Lean QbD® analizi sonuçları (Kırmızı özellikler "Kritik" materyal özellikleridir. Mavi özellikler "Kontrol edilmesi gereken" materyal özellikleridir. Yeşil özellikler "Kritik olmayan" materyal özellikleridir.)



Şekil 4.19. Kritik proses parametrelerinin (CPPs) tespiti amacıyla gerçekleştirilen Lean QbD® analizi sonuçları (Kırmızı parametreler "Kritik" proses parametreleridir. Mavi parametreler "Kontrol edilmesi gereken" proses parametreleridir. Yeşil parametreler "Kritik olmayan" proses parametreleridir.)

4.5. Plasebo filament formülasyonları üzerinde yapılan çalışmalar

3DP tablet formülasyonlarının hazırlanmasında çözünmeyi artırabilecek farklı polimer, plastikleştirici ve sürfaktanların etkisi incelenmek istenmiştir. Plasebo formülasyonlarında incelenen görünüm, kalınlık (mm), sertlik (kp), % uzama oranı ve kopma kuvveti (N) gibi mekanik özellikleri Çizelge 4.20’de sunulmuştur.

Elde edilen sonuçlara dayanarak rufinamit yüklenecek formülasyonlarda polimer karışımının “HPMC, Soluplus® ve Kollidon® VA 64” ve plastikleştiricinin “Triasetin” olmasına karar verilmiştir. Sürfaktan madde tipi ve oranı, rufinamit yüklü formülasyonlarda yapılacak çözünme testleri ile belirlenmiştir.

Çizelge 4.20. Plasebo filamentlerine ait mekanik özellikler (n=3, Ort ± SS)

Seri No	Mekanik Özellik	Görünüm	Kalınlık (mm)	Sertlik (kp)	% Uzama oranı	Kopma kuvveti (N)	
Farklı Polimerler	PL-01	Kırılğan	Beyaz mat	1,5±0,1	38,6±4,4	0,3±0,1	17,6±5,6
	PL-02	Elde edilemedi	-	-	-	-	-
	PL-03	Elde edilemedi	-	-	-	-	-
	PL-04	Elde edilemedi	-	-	-	-	-
	PL-05	Elde edilemedi	-	-	-	-	-
	PL-06	Elde edilemedi	-	-	-	-	-
	PL-07	Elde edilemedi	-	-	-	-	-
	PL-08	Kırılğan	Açık sarı berrak	1,7±0,1	7,8±2,5	0,0±0,0	0,0±0,0
	PL-09	Kırılğan	Beyaz mat	1,8±0,1	43,7±1,1	0,8±0,2	29,1±4,5
	PL-10	Esnek	Beyaz mat	1,7±0,1	54,1±0,1	0,6±0,1	52,3±3,6
	PL-11	Esnek	Açık sarı berrak	1,7±0,1	53,7±0,3	0,9±0,1	106,4±23,2
	PL-12	Kırılğan	Açık sarı berrak	2,2±0,1	53,7±0,2	0,9±0,1	59,4±7,2
	PL-13	Elde edilemedi	-	-	-	-	-
Farklı Plastikleştiriciler	PL-14	Esnek	Açık sarı berrak	1,7±0,1	53,1±1,7	0,6±0,1	17,1±4,0
	PL-15	Elde edilemedi	-	-	-	-	-
	PL-16	Esnek	Açık sarı berrak	1,8±0,1	42,6±2,3	0,5±0,1	13,5±3,3
	PL-17	Elde edilemedi	-	-	-	-	-
	PL-18	Elde edilemedi	-	-	-	-	-
	PL-19	Elde edilemedi	-	-	-	-	-
Farklı Sürtakımlar	PL-20	Elde edilemedi	-	-	-	-	-
	PL-21	Kırılğan	Açık sarı berrak	1,8±0,1	53,8±0,3	0,2±0,1	40,2±26,9
	PL-22	Esnek	Açık sarı berrak	1,8±0,1	14,0±0,1	0,6±0,1	4,9±1,5
	PL-23	Esnek	Açık sarı berrak	1,7±0,1	26,7±2,4	0,5±0,1	26,7±2,4
	PL-24	Esnek	Açık sarı berrak	1,6±0,1	53,8±0,1	0,4±0,1	26,0±2,8
	PL-25	Kırılğan	Beyaz mat	1,4±0,3	29,7±0,6	0,3±0,1	10,9±3,4
	PL-26	Kırılğan	Açık sarı berrak	1,7±0,1	26,3±8,3	0,3±0,1	10,9±3,4
	PL-27	Kırılğan	Beyaz mat	1,8±0,1	53,4±0,2	0,3±0,1	5,8±2,7
	PL-28	Esnek	Açık sarı berrak	1,8±0,1	44,0±4,5	0,4±0,1	21,3±2,9
	PL-29	Esnek	Açık sarı berrak	1,7±0,1	53,7±0,1	1,0±0,2	58,1±1,8
	PL-30	Esnek	Açık sarı berrak	1,8±0,1	53,6±0,4	2,1±0,6	53,6±9,1

4.6. Rufinamit yüklü 3DP tablet formülasyonlarının geliştirilmesi üzerine çalışmalar

Filament elde edilebilen uygun yardımcı maddelerle rufinamit içeren formülasyonlar çalışılmıştır. Bu amaçla hazırlanan farklı sürfaktan tiplerinin, sürfaktan oranlarının ve dispersantın etkisi incelenmiştir. İlaveten konvansiyonel tabletin de çözünme üzerinde etkisi incelenmek istenmiştir. Hazırlanan formülasyonlara ait fizikokimyasal ve mekanik özellikler Çizelge 4.21’de sunulmuştur.

İlaveten tespit edilen optimum formülasyon üzerinden farklı iç dolgu oranlarının (*infill ratio*) ve dış geometrilerin etkisini incelenmek için hazırlanan formülasyonlara ait fizikokimyasal ve mekanik özellikler Çizelge 4.22’de sunulmuştur.

Elde edilen fizikokimyasal ve mekanik özelliklere göre 3 boyutlu baskı makinesinde basılabilen formülasyonlarda çözünme incelenmiş ve optimum formülasyon çözünme özelliğine dayanarak tespit edilmiştir.

Elde edilen veriler doğrultusunda optimum formülasyon Çizelge 4.23’te sunulmuş olup, “Oblong” şekilli ve “%50” iç dolgu oranına sahip olması gerektiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.21. Farklı sürfaktan tipleri, sürfaktan oranları, dispersant etkisi ve konvansiyonel tabletin etkisinin incelenmesi için hazırlanan rufinamit yüklenen formülasyonlar üzerinde yapılan fizikokimyasal ve mekanik özellikler (n=3, Ort ± SS)

	Seri No	Filament					3DP Tablet				
		Mekanik Özellik	Kalınlık (mm)	Sertlik (kp)	% Uzama oranı	Kopma kuvveti (N)	% Miktar Tayini	Ağırlık (mg)	Sertlik (kp)	% Miktar Tayini	% Su Miktarı
Farklı Sürtaktan Tipleri	A01	Esnek	1,5 ±0,1	44,5 ±1,2	0,3 ±0,1	10,7 ±0,9	95,3 ±4,2	1314,6 ±15,5	7,0 ±0,2	101,9 ±0,4	1,8 ±0,1
	A03	Esnek	1,7 ±0,1	23,6 ±0,2	0,7 ±0,2	20,2 ±0,7	95,8 ±0,1	1319,8 ±16,1	8,0 ±0,5	98,5 ±1,8	1,6 ±0,1
	A04	Esnek	1,6 ±0,1	30,2 ±0,8	1,1 ±0,5	24,1 ±0,2	96,0 ±0,4	1340,0 ±21,5	7,8 ±0,1	95,2 ±3,8	1,6 ±0,1
	A05	Esnek	1,7 ±0,1	31,2 ±0,8	1,0 ±0,1	23,9 ±0,2	96,8 ±0,3	1347,7 ±31,8	6,8 ±0,4	98,8 ±1,0	1,6 ±0,1
	A06	Esnek	1,8 ±0,1	27,1 ±0,5	0,6 ±0,1	20,2 ±0,9	97,5 ±0,7	1310,3 ±12,8	7,2 ±0,5	93,3 ±0,1	1,7 ±0,1
	A05	Esnek	1,7 ±0,1	31,2 ±0,8	1,0 ±0,1	23,9 ±0,2	96,8 ±0,3	1347,7 ±31,8	6,8 ±0,4	98,8 ±1,0	1,6 ±0,1
Farklı Sürtaktan Oranları	A07	Elde edilemedi	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A08	Elde edilemedi	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A09	Elde edilemedi	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A10	Esnek	1,7 ±0,1	30,0 ±0,6	0,7 ±0,1	14,0 ±0,4	96,0 ±0,1	1327,0 ±2,6	7,4 ±0,1	95,0 ±0,4	1,7 ±0,1
	A11	Elde edilemedi	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A12	Esnek	1,7 ±0,1	20,8 ±3,6	0,7 ±0,1	9,6 ±4,2	97,0 ±1,1	1332,5 ±17,5	9,4 ±0,3	97,4 ±0,2	1,7 ±0,1
Dispersant İçermez	A17	Esnek	1,6 ±0,1	34,7 ±2,9	2,2 ±0,3	32,4 ±0,7	98,9 ±1,1	1328,8 ±13,5	10,2±0,1	97,9 ±1,7	1,7 ±0,1
Konvansiyonel Tablet	A05-KT	-	-	-	-	-	-	1330,4 ±1,6	4,1 ±0,2	97,1 ±0,9	1,8 ±0,1

Çizelge 4.22. Farklı iç dolgu oranları ve dış geometrilerin etkisinin incelenmesi için hazırlanan rufinamit yüklenen formülasyonlar üzerinde yapılan fizikokimyasal ve mekanik özellikler (Formülasyon No: A05) (n=3, Ort ± SS)

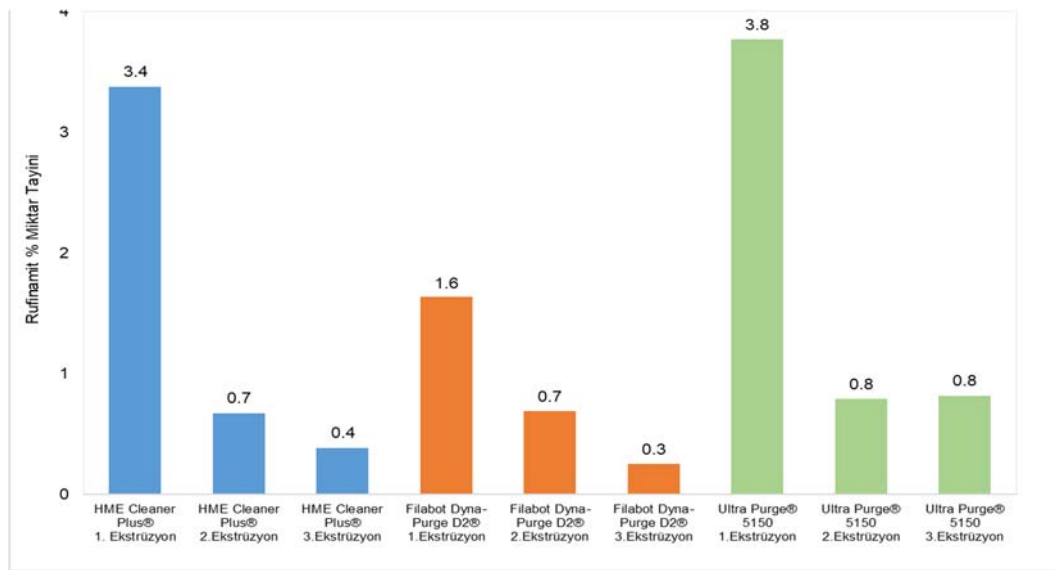
	İç Dolgu Oranı	Dış Geometri	3DP Tablet				
			Ağırlık (mg)	Sertlik (kp)	% Miktar Tayini	% Su Miktarı	
Farklı İç Dolgu Oranları	%10	Oblong	1351,5 ±39,9	3,4 ±0,2	96,6 ±0,6	1,7 ±0,1	
	%50		1347,7 ±31,8	6,8 ±0,4	98,8 ±1,0	1,6 ±0,1	
	%100		1348,6 ±24,1	9,5 ±0,6	96,1 ±0,4	1,7 ±0,1	
Farklı Dış Geometrilere	%50	Oblong	1347,7 ±31,8	6,8 ±0,4	98,8 ±1,0	1,6 ±0,1	
		Yarımküre	1339,4 ±27,7	7,1 ±0,4	98,6 ±0,4	1,7 ±0,1	
		Piramit	1363,4 ±29,9	6,7 ±0,3	97,4 ±0,7	1,6 ±0,1	

Çizelge 4.23. Optimum 3DP formülasyonuna ait içerik bilgisi

Hammadde	% Formül	Bir 3DP Tablet Formül (mg)	Kullanım Amacı	Kullanım oranı gerekçelendirmesi	
				Düşük Kullanım	Yüksek Kullanım
Rufinamid	% 15.0	200.0	Etkin madde	Tablet ağırlığı çok fazla olmaktadır.	Termoplastik özelliklerinin iyi olmaması nedeniyle 3DP baskıya uygun mekanik özelliklere sahip filament elde edilememektedir.
HPMC	% 20.0	266.6	Matriks polimeri	Kırılgan filamentler elde edilmektedir.	Çözünme yavaşlamaktadır.
Kollidon® VA 64	% 20.0	266.6	Dispersant	Çözünme yavaşlamaktadır.	Kırılgan filamentler elde edilmektedir.
Triasetin	% 7.0	93.3	Plastikleştirici	Filament elde edilememektedir.	Aşırı esnek ve 3DP için uygun olmayan yapıda filament elde edilmektedir.
Soluplus®	% 34.0	453.2	Çözünürlük ve biyoyararlanım artırıcı	Çözünme yavaşlamaktadır.	Kırılgan filament elde edilmektedir.
Gelucire® 48/16	% 4.0	53.3		Çözünme yavaşlamaktadır.	Kırılgan filament elde edilmektedir.
Toplam	%100	1333.0	-	-	-

4.7. Rufinamit içeren filament ekstrüzyonu sonrası ekstrüder temizlik yönteminin geliştirilmesi

Rufinamit içeren filamentlerin ekstrüzyonunun ardından, ekstrüderin temizlenmesi amacıyla temizlikte kullanılacak temizleyici madde tipi ve temizleyici madde miktarı analitik olarak çalışılmış olup elde edilen % miktar tayini sonuçları Şekil 4.20’de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre HME Cleaner Plus® maddesinin 60g ekstrüzyonunun, ekstrüderi yeterli derece temizlediği (<0.5) tespit edilmiş ve çalışmalar bu doğrultuda gerçekleştirilmiştir.



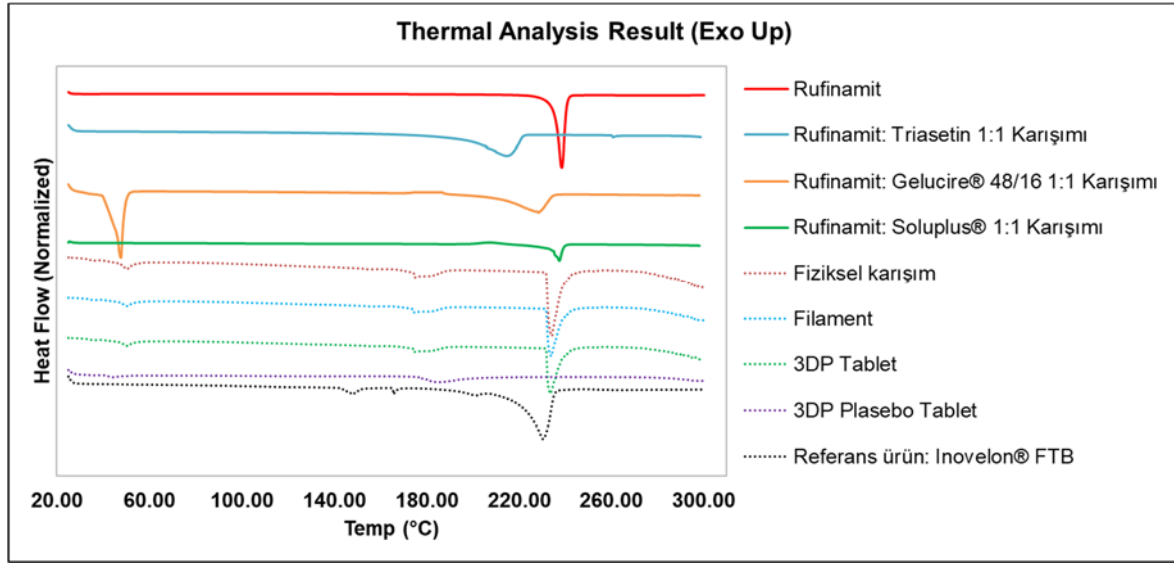
Şekil 4.20. Filament ekstrüderi temizleyici madde tipi ve miktarına bağlı olarak elde edilen rufinamit % miktar tayini verileri

4.8. Optimum Filament ve 3DP Tablet Formülasyonu Üzerinde Yapılan Kontroller

4.8.1. Geçimlilik testleri

DSC analizi

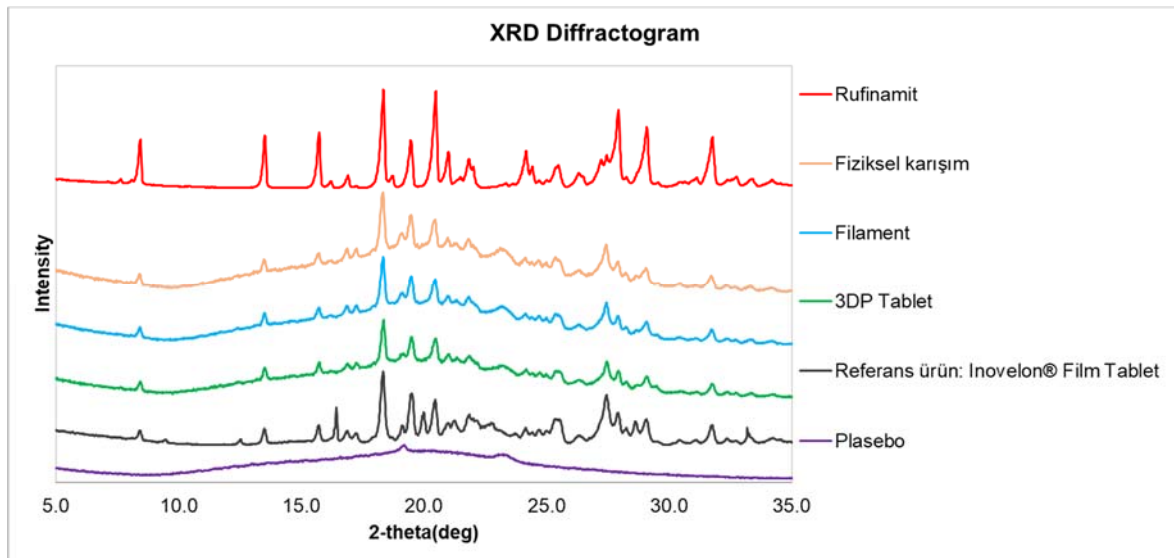
Deneyler Bölüm 3.3.1’de anlatıldığı gibi yapılmış ve etkin madde ile formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddeler arasında etkileşim olup olmadığı incelenmiş ve bir etkileşme olmadığı tespit edilmiştir. Deneyler sonucunda elde edilen grafikler Şekil 4.21’de gösterilmiştir.



Şekil 4.21. Rufinamit, Rufinamit: Triasetin 1:1 karışımı, Rufinamit: Gelucire® 48/16 1:1 karışımı, Rufinamit: Soluplus® 1:1 karışımı, fiziksel karışım, filament, 3DP tablet (A05), 3DP plasebo tablet ve referans ürün olan Inovelon® Film tablete ait DSC termogramı

XRD analizi

Deneyler Bölüm 3.3.1’de anlatıldığı gibi yapılmış ve etkin madde ile formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddeler arasında etkileşim olup olmadığı incelenmiş ve etkileşim olmadığı tespit edilmiştir. Deneyler sonucunda elde edilen grafikler Şekil 4.22 ve Çizelge 4.24’te gösterilmiştir.



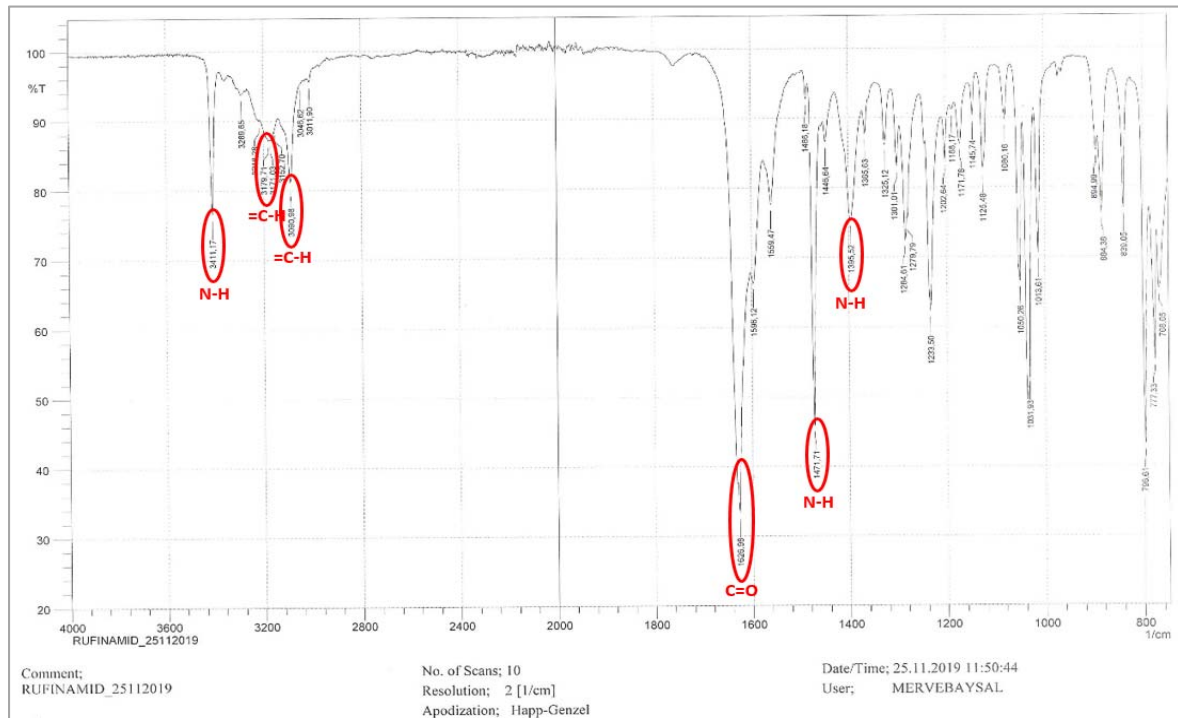
Şekil 4.22. Rufinamit, fiziksel karışım, filament, 3DP tablet (A05), 3DP plasebo tablet ve referans ürün olan Inovelon® Film tablete ait XRD difraktogramı

Çizelge 4.24. Rufinamit, fiziksel karışım, filament, 3DP tablet (A05), 3DP plasebo tablet ve referans ürün olan Inovelon® Film tablete ait XRD difraktogramı verileri

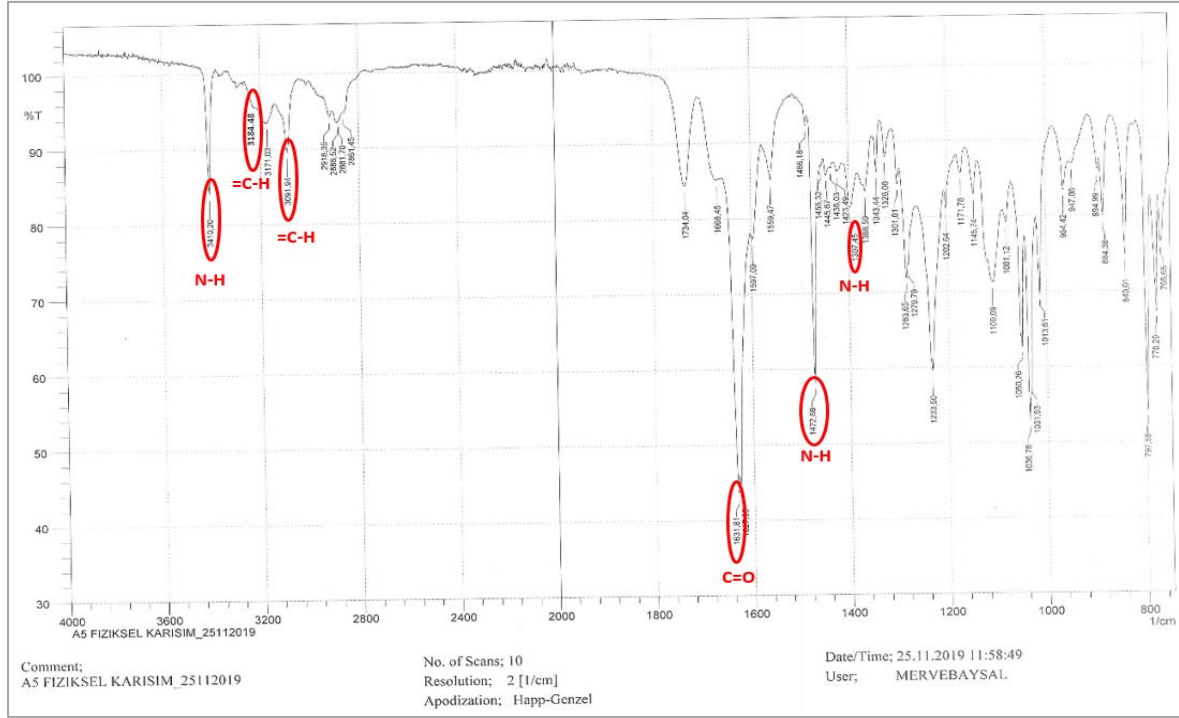
2Theta	Intensity	Rufinamit	Fiziksel Karışım	Filament	3DP Tablet	Plasebo	Inovelon® Film Tablet
8,4	Orta	+	+	+	+	-	+
17,2	Orta	+	+	+	+	-	+
18,3	Çok Kuvvetli	+	+	+	+	-	+
19,5	Kuvvetli	+	+	+	+	-	+
20,4	Orta	+	+	+	+	-	+
21,8	Orta	+	+	+	+	-	+
25,4	Orta	+	+	+	+	-	+
25,6	Orta	+	+	+	+	-	+
27,4	Kuvvetli	+	+	+	+	-	+
27,9	Orta	+	+	+	+	-	+
28,3	Orta	+	+	+	+	-	+
29,0	Orta	+	+	+	+	-	+
31,8	Orta	+	+	+	+	-	+

FTIR spektrumu

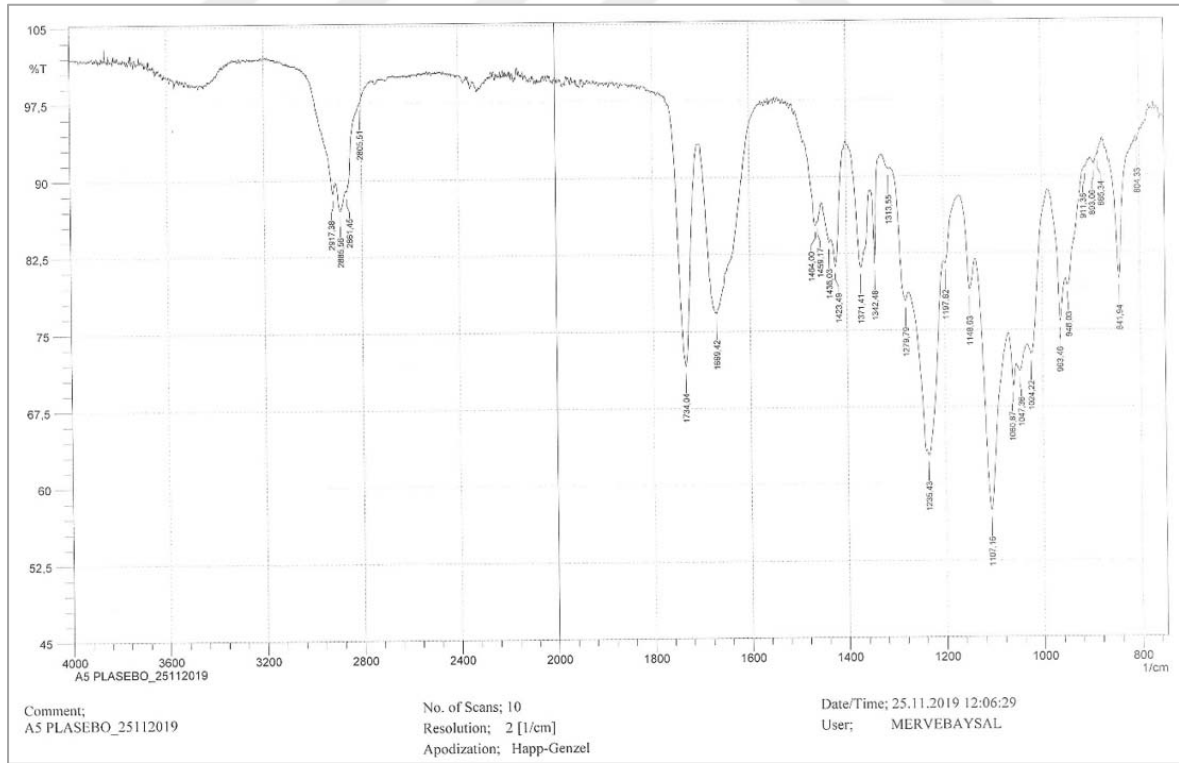
Elde edilen FTIR spektrumları Şekil 4.23-Şekil 4.27’de, spesifik dalga sayıları ile ilgili veriler Çizelge 4.25’te sunulmuştur. Rufinamit etkin maddesine spesifik tüm dalga sayıları optimum formülde gözlenmiştir.



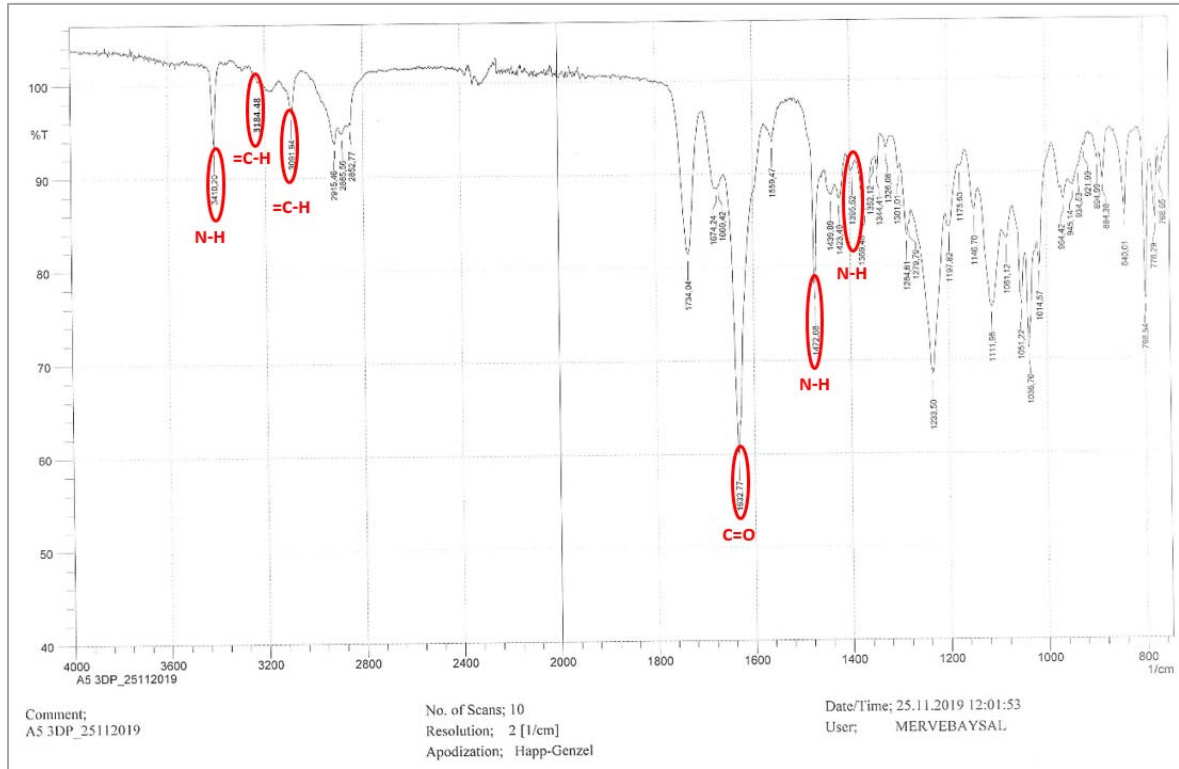
Şekil 4.23. Rufinamit FTIR Spektrumu



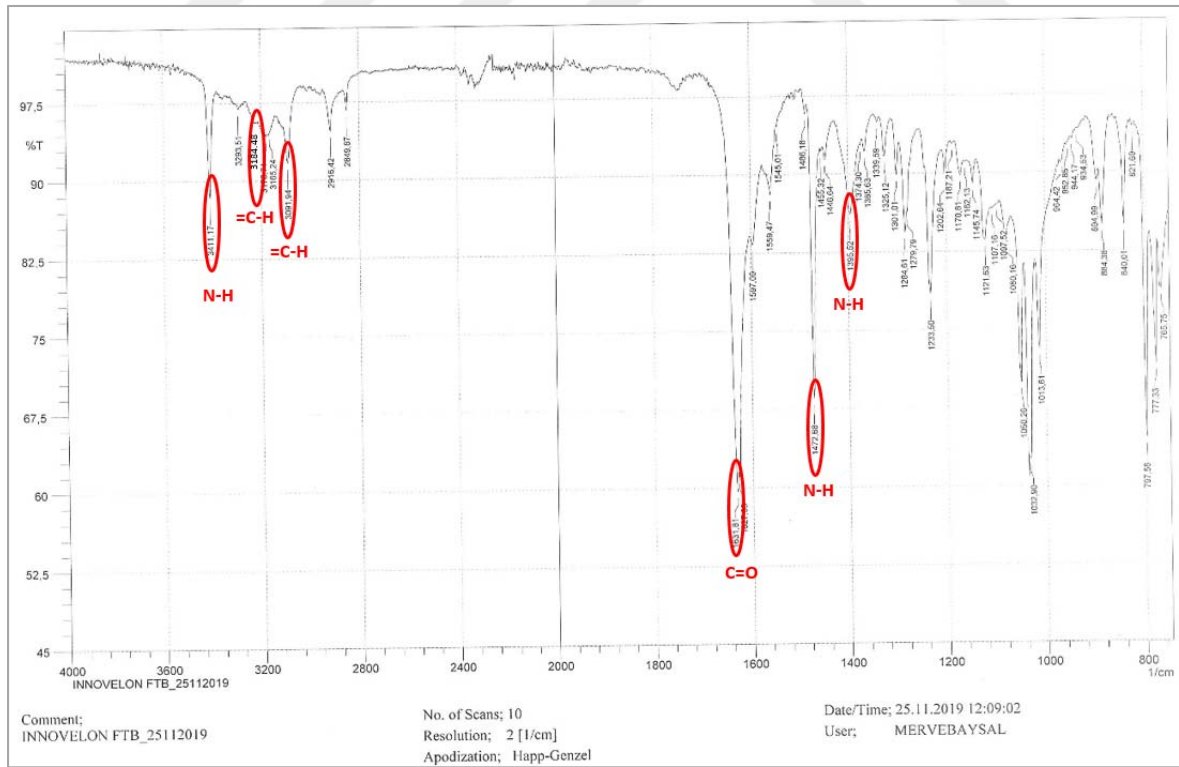
Şekil 4.24. Optimum formülasyona (A05) ait fiziksel karışım (rufinamid içerir) FTIR Spektrumu



Şekil 4.25. Optimum formülasyona (A05) ait plasebo fiziksel karışımı (rufinamid içermez) FTIR Spektrumu



Şekil 4.26. Optimum formülasyona (A05) ait 3DP tablet FTIR Spektrumu



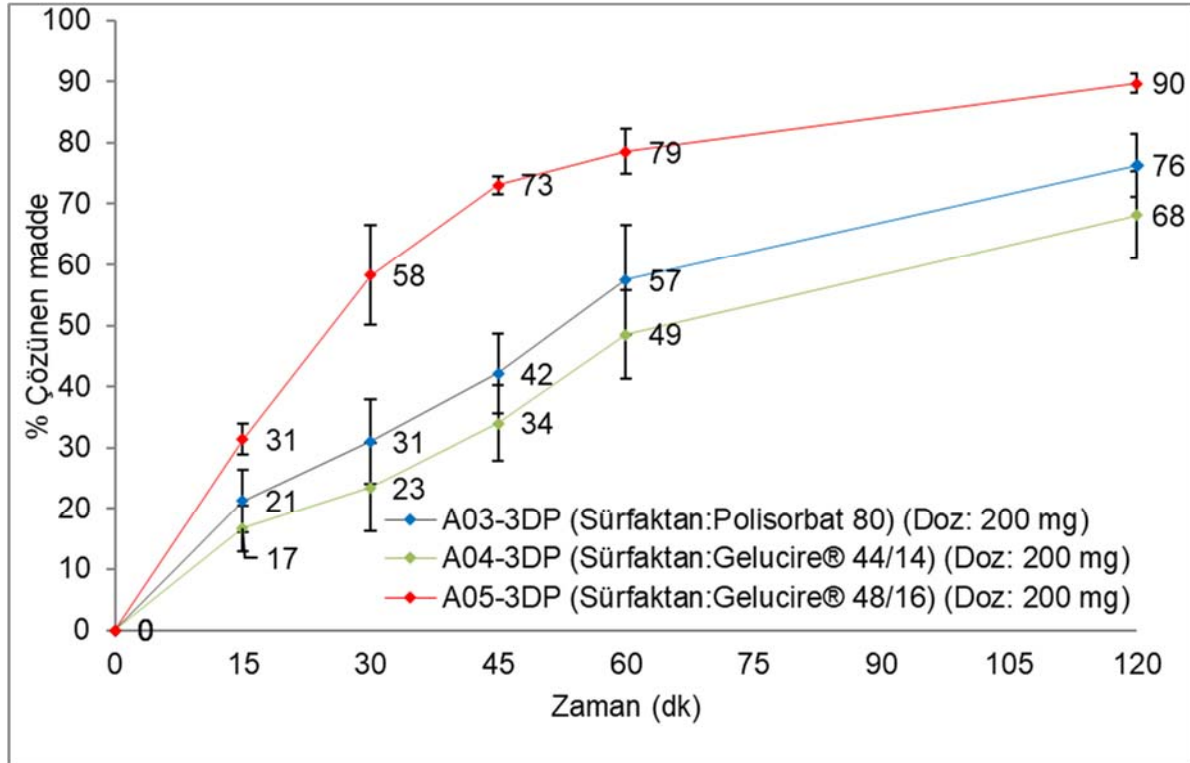
Şekil 4.27. Referans ürün (Inovelon® Film Tablet) FTIR Spektrumu

Çizelge 4.25. Rufinamit, Optimum formülasyona ait fiziksel karışım (rufinamit içerir), Optimum formülasyona ait plasebo fiziksel karışımı (rufinamit içermez), Optimum formülasyona ait 3DP tablet ve referans ürün (Inovelon® Film Tablet) Spesifik dalga sayıları

Numune Adı	Dalga Sayıları (cm ⁻¹)		
	Beklenen (Pietro, Dario ve Gabriele, 2012; Portman ve diğerleri, 2004)		Elde Edilen
	Dalga Sayısı (cm ⁻¹)	Kimyasal Bağlar	Tamamı elde edilmiştir.
- Rufinamit - Optimum formülasyona ait fiziksel karışım (rufinamit içerir) - Optimum formülasyona ait 3DP tablet - Referans ürün (Inovelon® Film Tablet)	1396,46 cm ⁻¹	N-H bağı	
	1473,62 cm ⁻¹	N-H bağı	
	1631,78 cm ⁻¹	C=O bağı	
	3095,75 cm ⁻¹	=C-H bağı	
	3184,48 cm ⁻¹	=C-H bağı	
	3412,08 cm ⁻¹	N-H bağı	
Optimum formülasyona ait plasebo fiziksel karışımı (rufinamit içermez)	Pik beklenmemektedir.		Pik elde edilmemiştir.

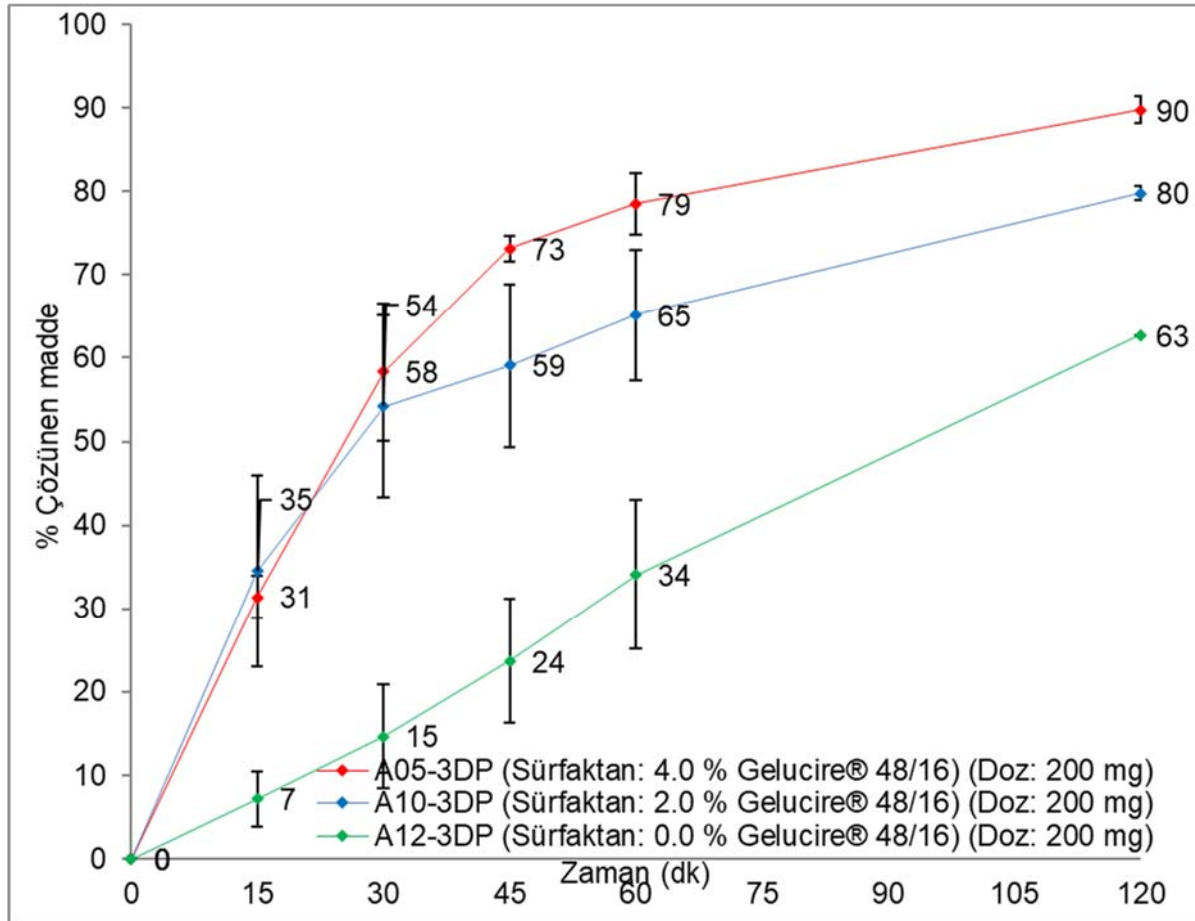
4.8.2. In-vitro çözünme tayini

3DP tablet formülasyon geliştirme çalışmasında öncelikle sürfaktan tipi belirlenmiştir. Bu amaçla gerçekleştirilen çözünme çalışmalarına ait veriler Şekil 4.28’de sunulmuştur. Elde edilen çözünme verilerine dayanarak en yüksek çözünme değerinin elde edilebildiği optimum sürfaktanın “Gelucire® 48/16” olduğu tespit edilmiştir.



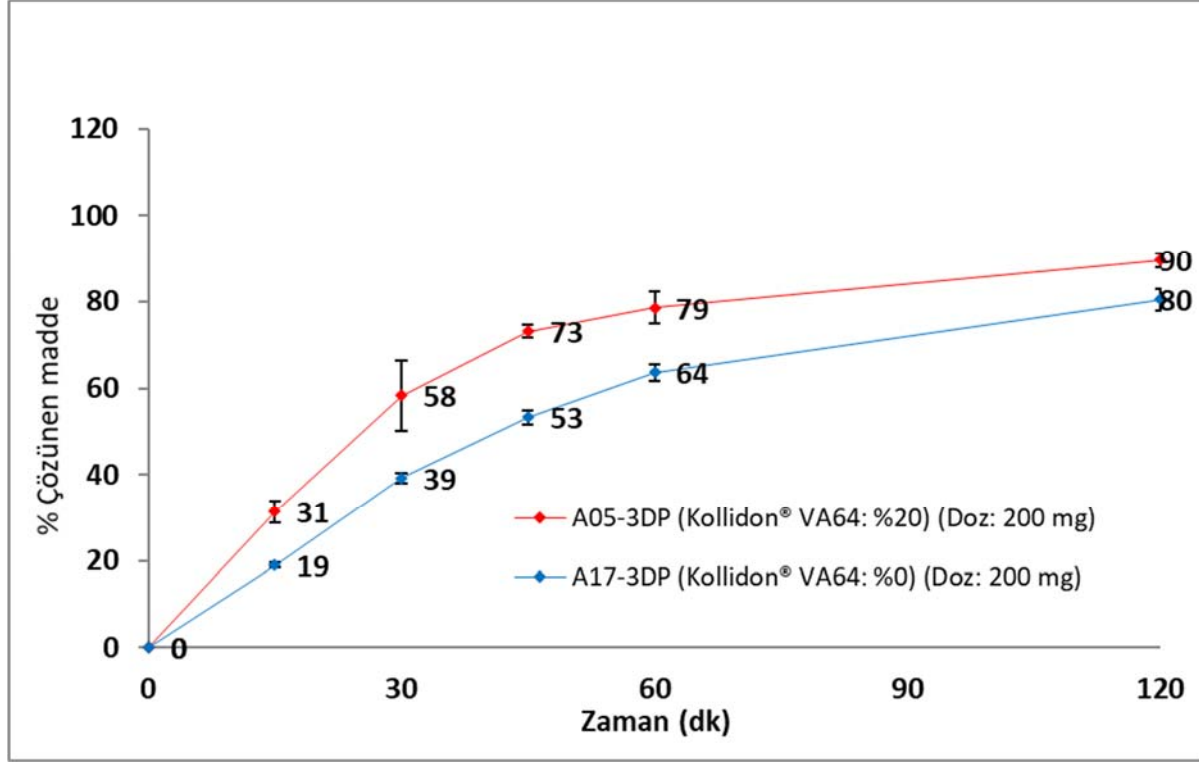
Şekil 4.28. Farklı tiplerde sürfaktan içeren 3DP tabletlerden rufinamitin çözünme verileri (%2 SLS içeren saf su, 900 mL, 37°C) (n=3, Ort ± SS)

Süpfaktan tipinin belirlenmesinin ardından, süpfaktan oranının etkisi incelenmiş ve elde edilen çözünme verileri Şekil 4.29’da sunulmuştur. Elde edilen çözünme verileri, rufinamit çözünmesinin formülasyonda kullanılan süpfaktan miktarı ile orantılı olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte filament elde edilebilen en yüksek süpfaktan oranı %4 olduğu için optimum süpfaktan oranı %4 olarak kabul edilmiştir.



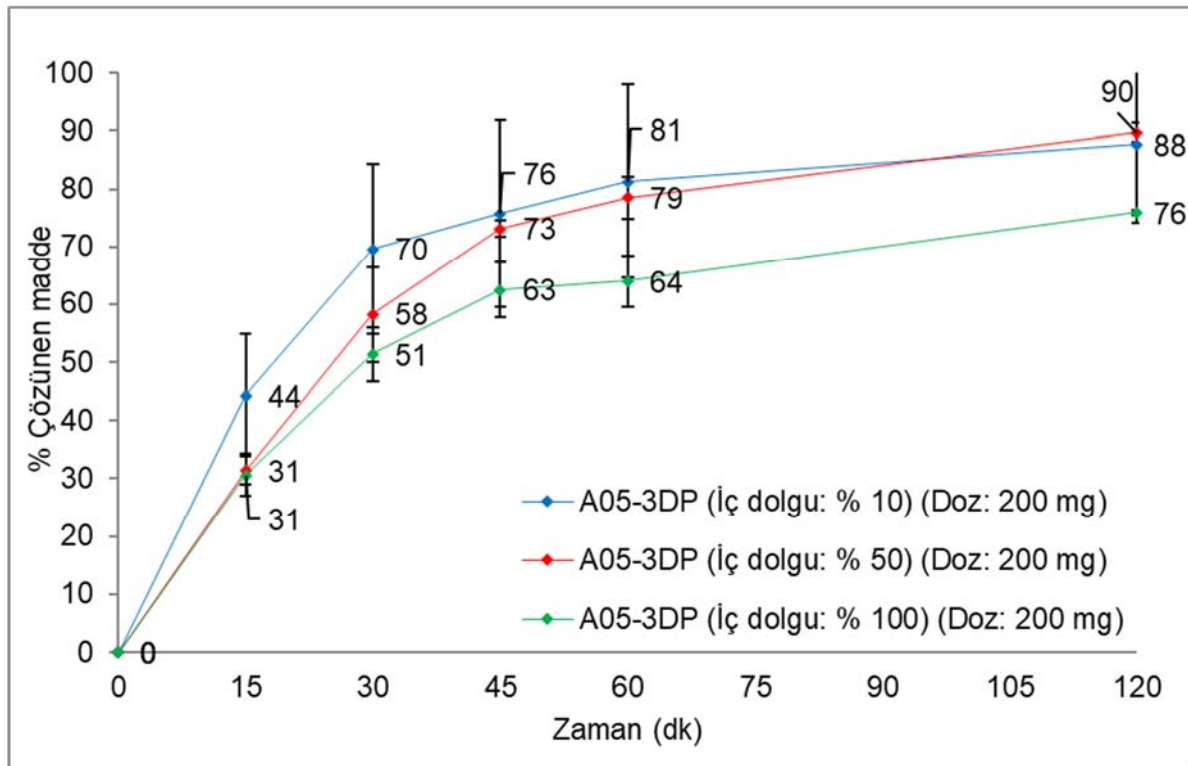
Şekil 4.29. Farklı oranlarda süpfaktan içeren 3DP tabletlerden rufinamitin çözünme verileri (%2 SLS içeren saf su, 900 mL, 37°C) (n=3, Ort ± SS)

Formülasyonda polimer karışımında dispersant olarak kullanılan Kollidon® VA 64'ün çözünme üzerindeki etkisi incelenmiş ve Şekil 4.30'da sunulmuştur. Elde edilen veriye dayanarak Kollidon® VA64'ün kullanımının çözünmeyi artırıcı etkisi olduğu tespit edilmiştir.



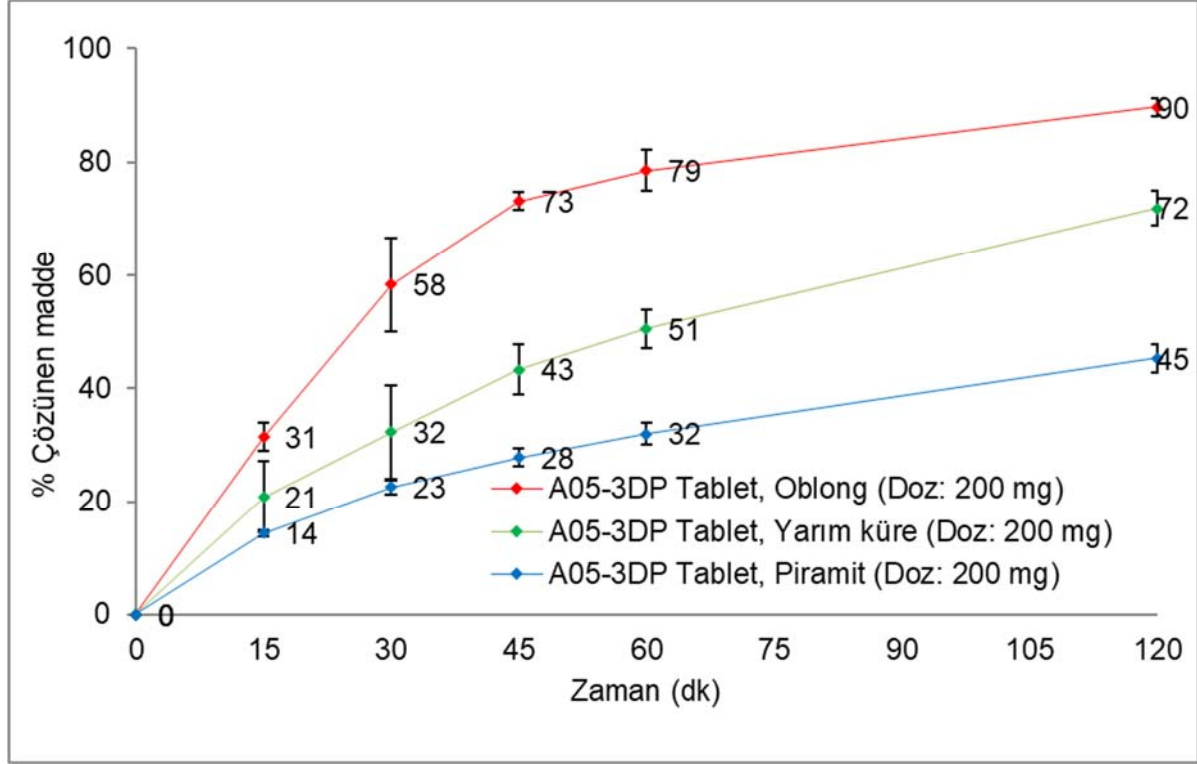
Şekil 4.30. Optimum 3DP tablet formülasyonu için dispersant içermeyen tabletlerden rufinamitin çözünme verileri (%2 SLS içeren saf su, 900 mL, 37°C) (n=3, Ort $\pm$ SS)

Optimum sürfaktan tipi ve miktarının belirlenmesinin ardından, formülasyonun 3D baskı esnasında tasarlanan iç dolgu oranının çözünme üzerindeki etkisi incelenmiş ve Şekil 4.31’de sunulmuştur. Çözünme verilerine göre beklenildiği gibi düşük iç dolgu oranına sahip 3DP tabletlerde çözünme en hızlı şekilde gerçekleşmiştir fakat tabletlerin görünümü uygun değildir ve dayanıksızdır. Bu nedenle 3DP tabletlerde hem yüksek çözünme elde edilebilecek hem de mekanik özellikleri uygun olan optimum iç dolgu oranının %50 olduğu tespit edilmiştir.



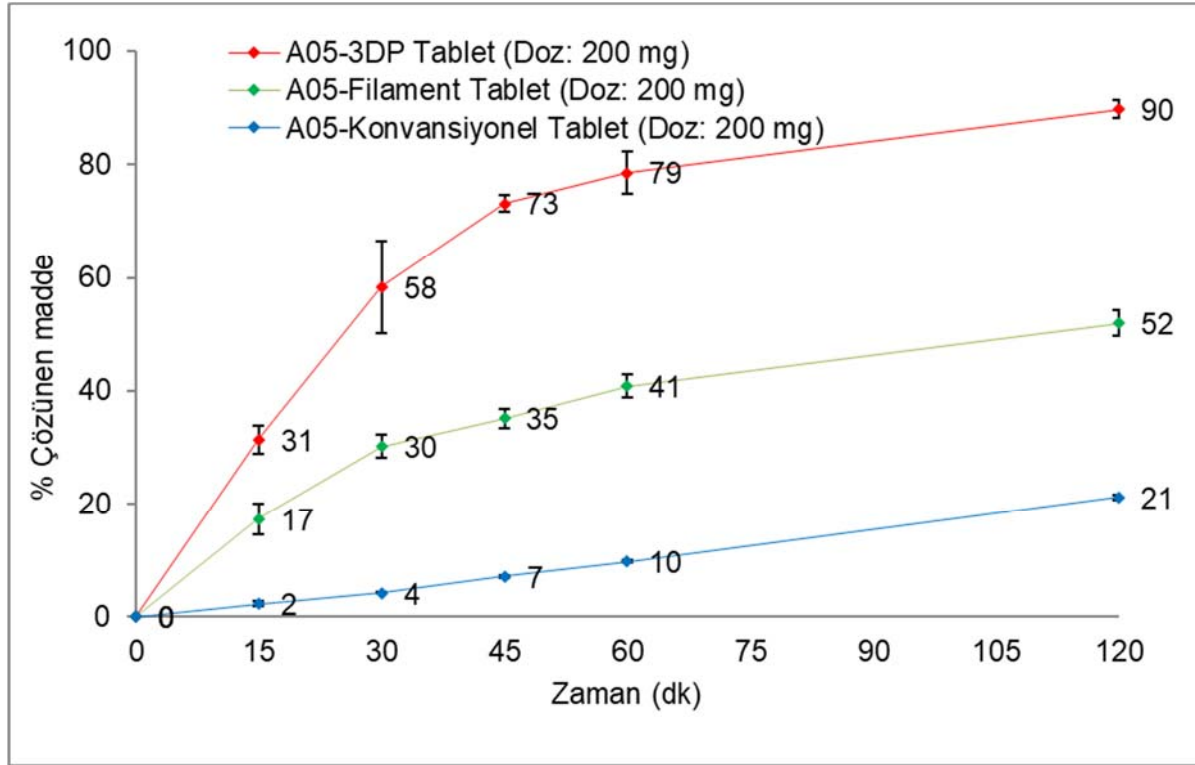
Şekil 4.31. Farklı iç dolgu oranlarında tasarlanmış 3DP tabletlerden rufinamitin çözünme verileri (%2 SLS içeren saf su, 900 mL, 37°C) (n=3, Ort ± SS)

İç dolgu oranı tespit edilen tabletlerin 3DP geometrilerinin çözünme üzerindeki etkisi incelenmiş ve Şekil 4.32’de sunulmuştur. Bu çalışmada elde edilen verilere göre en yüksek çözünme oblong tablet ile elde edildiği için optimum 3DP geometrisinin “oblong” olarak belirlenmiştir.



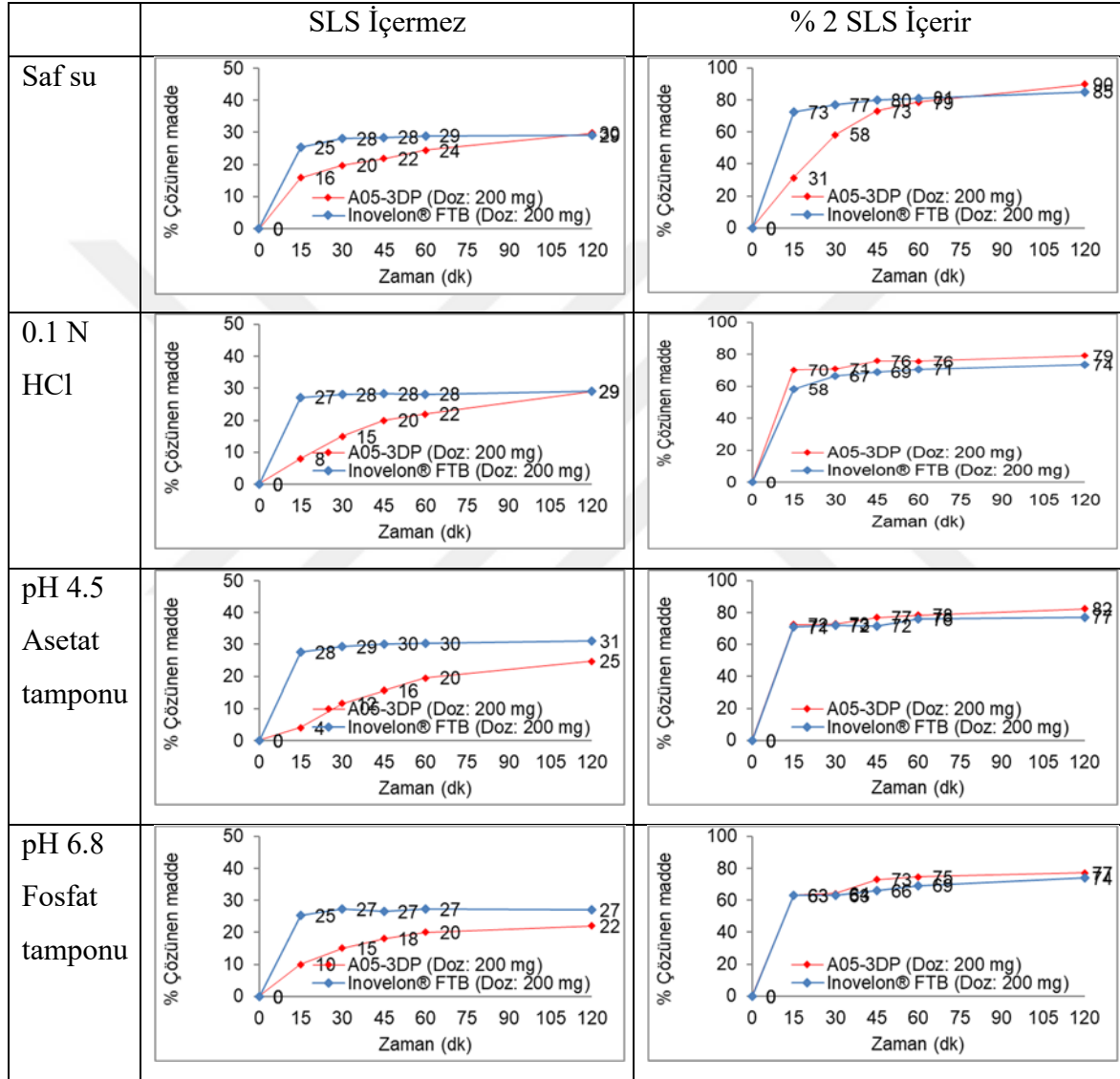
Şekil 4.32. Farklı dış geometrilerde tasarlanmış 3DP tabletlerden rufinamitin çözünme verileri (%2 SLS içeren saf su, 900 mL, 37°C) (n=3, Ort ± SS)

Üretim yönteminin çözünme üzerindeki etkisi de incelenmiş olup çözünme profilleri Şekil 4.33'da sunulmuştur. Elde edilen verilerde filament ekstrüzyonu esnasında erime sonucu meydana gelen katı dispersiyonun çözünmeyi artırdığı, ilaveten 3DP tasarım ile çözünmenin daha da yükseldiği tespit edilmiştir.



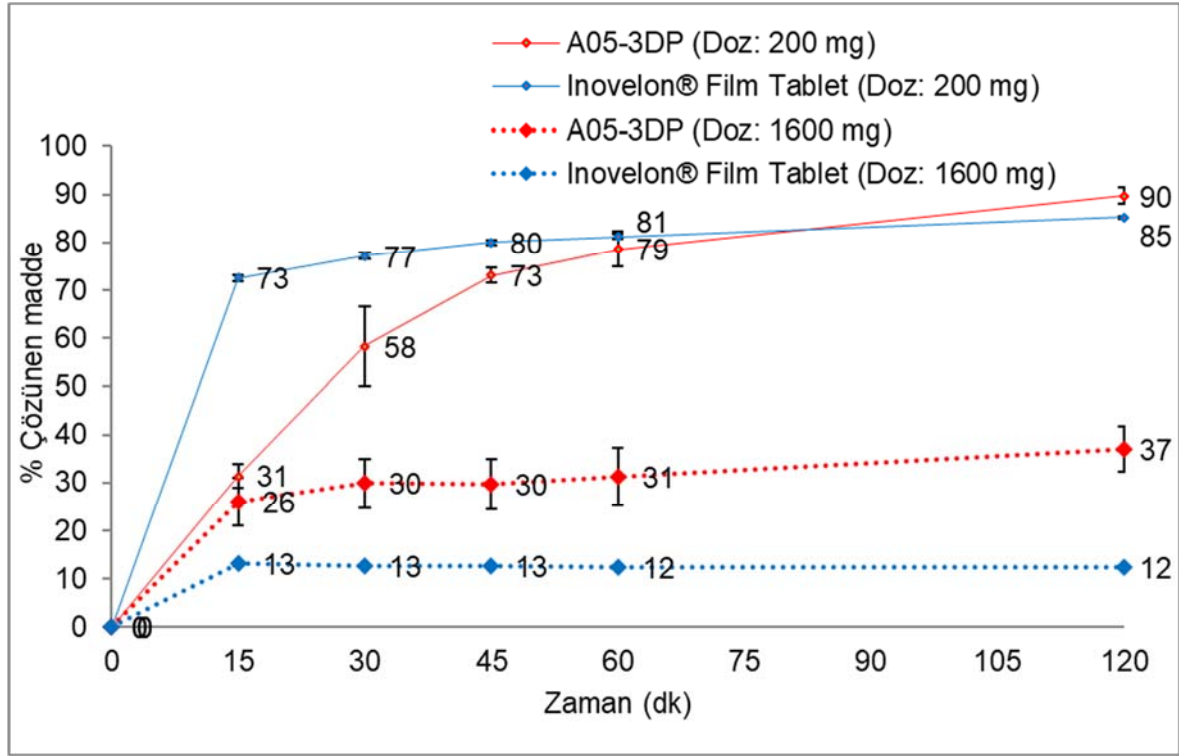
Şekil 4.33. Optimum 3DP tablet formülasyonu için farklı üretim basamaklarından rufinamitin çözünme verileri (%2 SLS içeren saf su, 900 mL, 37°C) (n=3, Ort $\pm$ SS)

Optimum 3DP tablet formülasyon ve referans ürünün SLS içeren ve içermeyen ortamlarda farklı pH'larda çözümleri karşılaştırılmış ve Şekil 4.34'te sunulmuştur. Elde edilen verilere göre hem optimum formülasyon, hem de referans ürünün çözünmesi pH'tan bağımsızdır. SLS içermeyen ortamlarda çözünme oldukça düşüktür ve sink koşul sağlanmamaktadır (Liu, 2013).



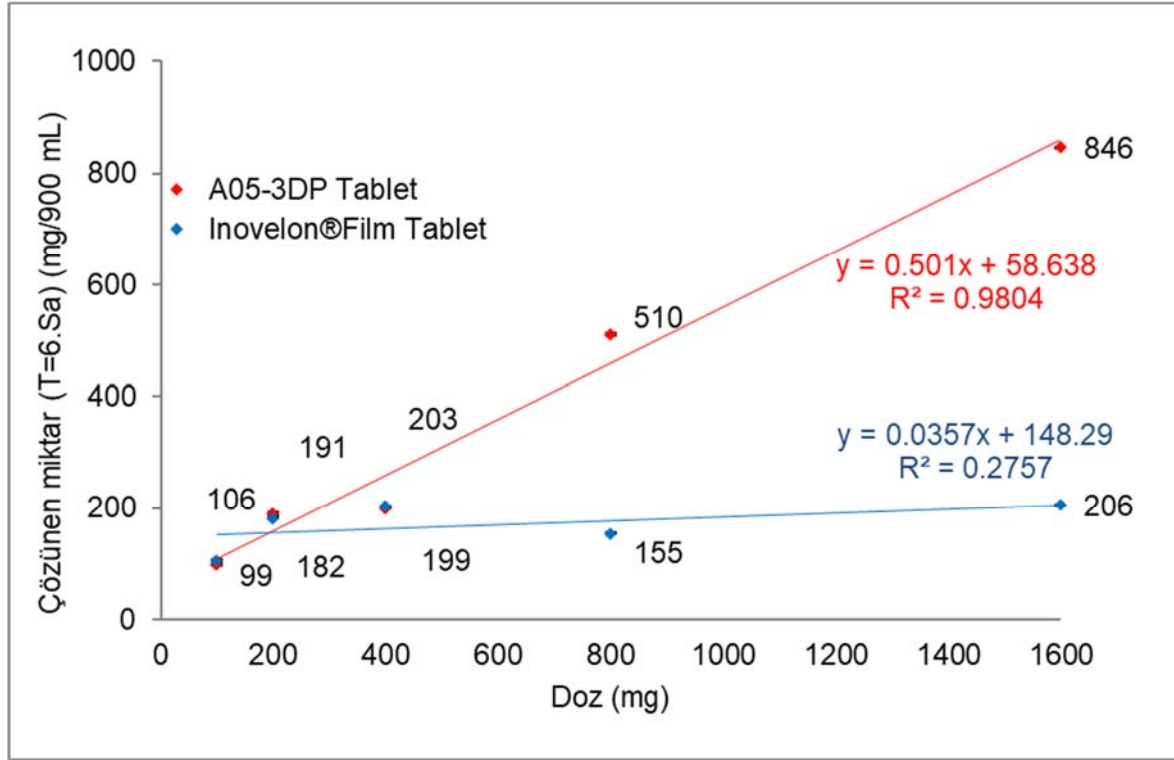
Şekil 4.34. Optimum 3DP tablet formülasyonu (A05) ve referans ürünün farklı pH'larda çözünme karşılaştırması (900 mL, 37°C) (n=3, Ort ± SS)

Optimum 3DP tablet formülasyon ve referans ürünün farklı dozlarında çözünmeleri karşılaştırılmış ve Şekil 4.35'te sunulmuştur. Elde edilen veriye göre 200 mg dozda referans ürün daha yüksek çözünme gösterirken terapötik doz olan 1600 mg dozda geliştirilen optimum formülasyonun çok daha yüksek çözündüğü tespit edilmiştir.



Şekil 4.35. 200 mg ve Terapötik dozlarda optimum 3DP tablet formülasyonu ve referans ürünlerden (Inovelon® Film Tablet) rufinamitin çözünme verileri (%2 SLS içeren saf su, 900 mL, 37°C) (n=3, Ort ± SS)

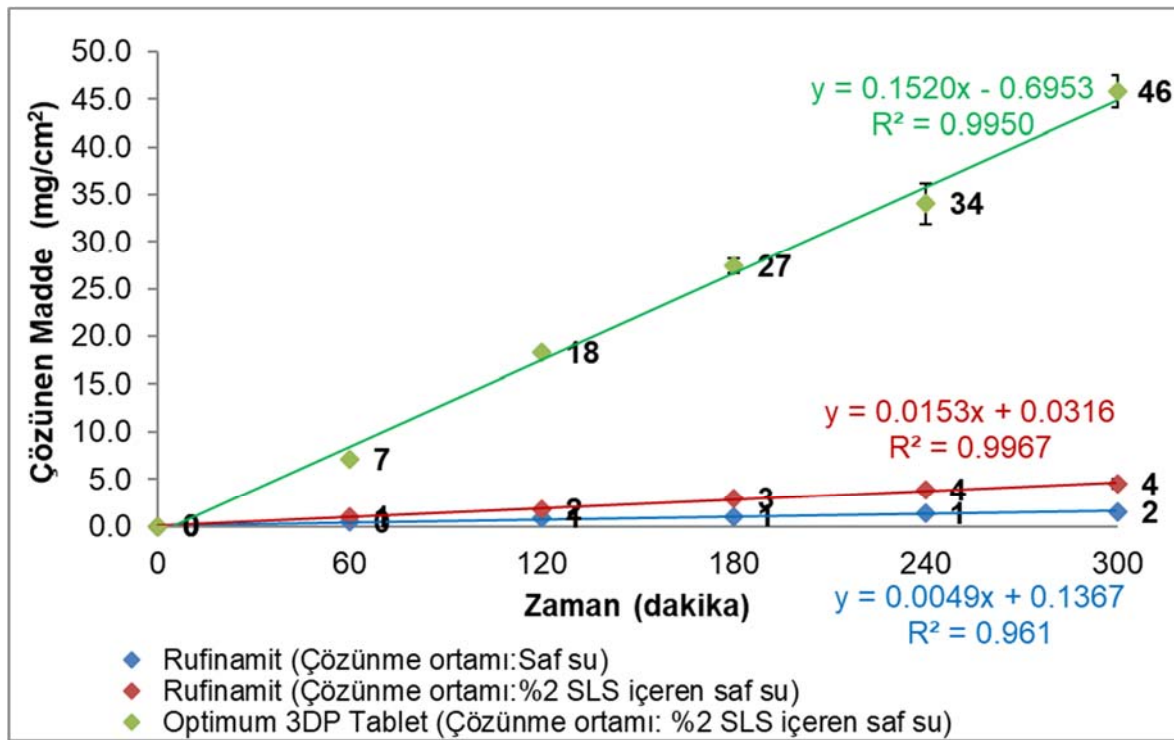
Son olarak farklı dozlarda (100 – 200 – 400 – 600 – 800 – 1600 mg) gerçekleştirilen çözünme çalışmalarından elde edilen verilerle in-vitro salım için doğrusallık incelenmiş ve Şekil 4.36'da sunulmuştur. Şekilden de görülebildiği gibi referans üründe doz arttıkça çözünen madde miktarı doğrusal artmamakta iken (r^2 : 0.2757), geliştirilen optimum formülasyonda salım doğrusal olarak artmaktadır (r^2 :0.9804).



Şekil 4. 36. Farklı dozlarda optimum 3DP tablet formülasyonu tabletlerinden rufinamitin çözünme verileri ve in-vitro doğrusallık (%2 SLS içeren saf su, 900 mL, 37°C) (n=3, Ort ± SS)

4.8.3. İntrinsik çözünme tayini

Farklı çözünme ortamlarında saf etkin madde ve optimum 3DP tabletlerden rufinamitin intrinsik çözünme hızı tayini (IDR) yapılmıştır. Elde edilen veriler Şekil 4.37 ve Çizelge 4.26'da sunulmuştur. Elde edilen veriler, rufinamitin çözünürlüğünün, çözünme ortamındaki sürfaktan miktarından çok fazla etkilendiğini göstermektedir. İlaveten geliştirilen optimum formülasyondan rufinamitin intrinsik çözünme hızı, saf etkin maddenin yaklaşık 10 kat üzerindedir.



Şekil 4.37. Farklı çözünürlük ortamlarında saf etkin madde (rufinamit) ve optimum 3DP tabletlerden rufinamitin intrinsik çözünme verileri (n=3, Ort ± SS)

Çizelge 4.26. Farklı çözünürlük ortamlarında saf etkin madde (rufinamit) ve optimum 3DP tabletlerden rufinamitin intrinsik çözünme hızı verileri (n=3, Ort ± SS)

Numune Adı	Çözünme Ortamı	r ²	IDR (mg/dk/cm ²)
Rufinamit	Saf su	0,9610	0,0049
Rufinamit	%2 SLS içeren saf su	0,9967	0,0153
Optimum 3DP Tablet	%2 SLS içeren saf su	0,9950	0,1520

4.8.4. Salım kinetiği

Tüm formülasyonların zamana karşı elde edilen kümülatif salım profilleri sonuçlarından hesaplanan salım kinetikleri ve uyum ölçütleri Çizelge 4.27’de sunulmuştur. Tüm formülasyonların Weibull kinetiği ile salım yaptığı tespit edilmiştir.



Çizelge 4.27. Farklı formülasyonlara ait salım kinetikleri ve uyum ölçütleri

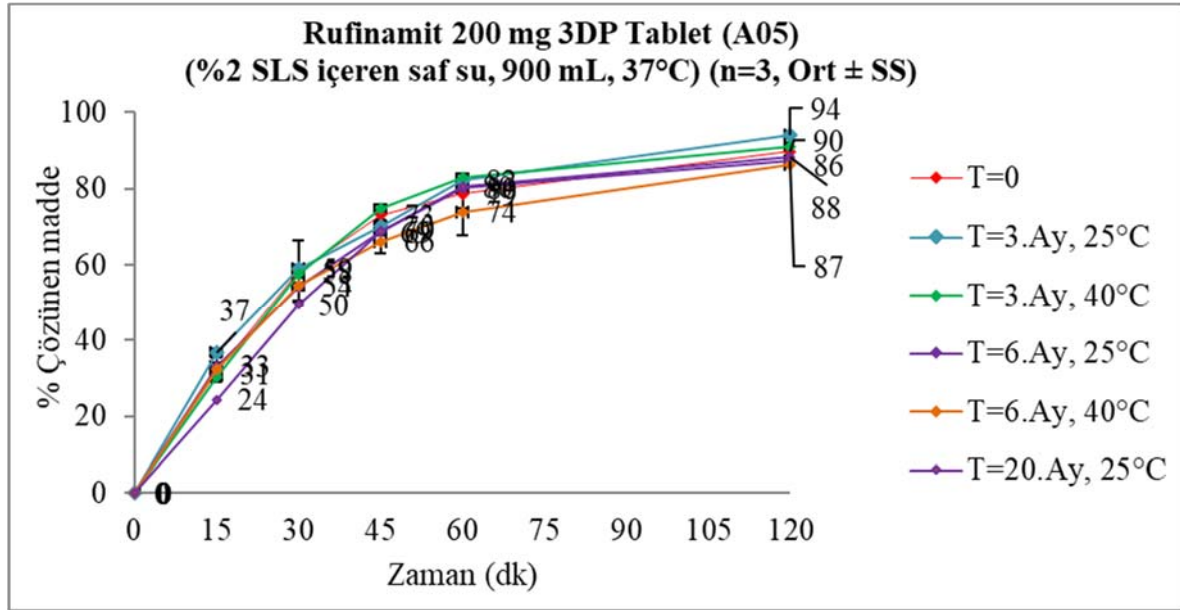
Salım Kinetiği	Eşitlik	Uyum Ölçütleri	A03-3DP	A04-3DP	A05-3DP	A10-3DP	A12-3DP	A05-3DP (İç dolgu: % 10)	A05-3DP (İç dolgu: % 100)	Inovelon® FTB	A05-Konv. Tablet	A05-Filament Tablet	A05-3DP, Yarımküre	A05-3DP, Piramit	A17-3DP
1, derece	$F=100*[1-\text{Exp}(-k^1*t)]$	r ₂	0,7327	0,4874	-0,6288	-1,7966	0,1073	-1,4738	-0,2154	-2,3353	0,9827	0,5332	0,9866	0,8623	0,0632
		k _i	0,0057	0,0029	0,0037	0,0018	0,0014	0,0032	0,0036	0,0033	0,0018	0,0027	0,0132	0,0035	0,0033
		AIC	64,3302	68,1672	77,8134	78,2261	69,3418	79,9384	74,6183	81,5893	41,2460	65,8956	39,9436	58,4531	73,4779
		MSC	0,6966	0,0965	-1,4884	-2,2428	-0,3949	-2,2468	-1,1119	-3,2492	3,7281	0,1641	3,6917	1,5101	-0,6532
Hignuchi	$F=kH^{0,5}t^{0,5}$	r ₂	0,4506	0,5524	-0,4703	-0,9151	0,4677	-1,0229	-0,1085	-1,7459	0,9360	0,6449	0,5202	0,7740	0,1624
		k _{Hi}	3,5857	3,1851	3,8115	3,0951	2,3683	3,7765	3,6290	3,8633	2,4206	0,6449	3,5239	3,1064	3,5143
		AIC	70,0947	67,0834	76,9945	75,1973	65,2054	78,3287	73,8823	80,0337	51,7184	3,0200	68,5706	62,4166	72,5831
		MSC	-0,0240	0,2320	-1,3860	-1,8642	0,1221	-2,0456	-1,0199	-3,0548	2,4191	63,7077	0,1133	1,0147	-0,5413
Korsmeyer-Peppas	$F=kKP*t^n$	r ₂	0,7970	0,8054	0,7989	0,8433	0,4421	0,8887	0,8855	0,9950	0,7339	0,4376	0,8390	0,8763	0,7199
		k _{KP}	15,3485	10,7636	28,8685	32,7333	3,5778	42,8403	30,6515	65,0895	0,2817	0,8979	14,9394	7,1696	13,8971
		AIC	64,1296	62,4212	63,0806	57,1714	67,5815	57,1271	57,7188	31,4958	65,1193	12,1441	61,8335	59,5945	65,8194
		MSC	0,7217	0,8147	0,3532	0,3890	-0,1749	0,6046	1,0006	3,0124	0,7439	55,7405	0,9554	1,3675	0,3041
Hixson-Crowell	$F=100*[1-(1-kHC*t)^3]$	r ₂	0,3444	0,2900	-1,0507	-2,0564	-0,0277	-1,8863	-0,5995	-2,8183	0,9885	0,3508	0,4525	0,7153	-0,2271
		k _{HC}	0,0010	0,0007	0,0008	0,0005	0,0004	0,0007	0,0008	0,0008	0,0007	0,0006	0,0011	0,0008	0,0008
		AIC	71,5085	70,7735	79,6562	78,9368	70,4685	81,1724	76,8155	82,6713	37,9763	68,5353	69,6270	64,2633	75,6380
		MSC	-0,2007	-0,2293	-1,7187	-2,3317	-0,5358	-2,4010	-1,3865	-3,3845	4,1368	-0,1658	-0,0188	0,7839	-0,9232
Hopfenberg	$F=100*[1-(1-kHB*t)^n]$	r ₂	0,3527	0,2900	-1,0498	-2,0468	-0,0022	-1,8863	-0,5990	-2,8181	0,9876	-0,1658	0,4849	0,7154	-0,2270
		k _{HB}	0,0010	0,0007	0,0008	0,0003	0,0003	0,0007	0,0008	0,0008	0,0004	0,0006	0,0011	0,0008	0,0008
		AIC	73,4064	72,7735	81,6527	80,9118	72,2677	83,1722	78,8127	84,6709	40,5906	70,5353	71,1384	66,2600	77,6373
		MSC	-0,4379	-0,4793	-1,9683	-2,5785	-0,7607	-2,6510	-1,6362	-3,6344	3,8100	-0,4158	-0,2077	0,5343	-1,1731
Baker-Lonsdale	$3/2*[1-(F/100)^{(2/3)}]-F/100=kBL*t$	r ₂	0,6279	0,7709	-0,3961	-1,5366	0,5105	-1,2955	0,1623	-2,3159	0,8618	0,8692	0,7433	0,8678	0,3799
		k _{BL}	0,0003	0,0003	0,0002	0,0001	0,0001	0,0002	0,0003	0,0001	0,0002	0,0003	0,0003	0,0002	0,0003
		AIC	66,9778	61,7244	76,5802	77,4457	64,5349	79,3401	71,6415	81,5426	57,8819	55,7166	63,5669	58,1286	70,1779
		MSC	0,3657	0,9018	-1,3342	-2,1453	0,2059	-2,1720	-0,7398	-3,2434	1,6486	1,4365	0,7388	1,5507	-0,2407
Weibull	$F=100*\{1-\text{Exp}[-((t-Ti)^{\beta}/\alpha)]\}$	r ₂	0,9875	0,9580	0,9545	0,9076	0,7710	0,9604	0,9838	0,9984	0,9924	0,9899	0,9988	0,9669	0,9530
		β	0,6461	0,5499	0,3845	0,2097	0,5448	0,2551	0,4703	0,1378	1,0405	0,4966	0,6945	0,6408	0,4979
		AIC	43,8050	52,1617	53,1941	54,9454	62,4582	50,8552	44,0972	24,4950	38,7235	39,1951	24,9637	51,0415	53,5329
		MSC	3,2623	2,0972	1,5890	0,6673	0,4655	1,3886	2,7033	3,8875	4,0434	3,5017	5,5642	2,4366	1,8400

4.8.5. In-vitro stabilite çalışmaları

Hazırlanan optimum tabletlerin fizikokimyasal stabilitesi (tablet boyutu, ağırlığı, sertliği, miktar tayini, su miktarı, çözünme) ICH Q1A (R2) kılavuzuna uygun olacak şekilde $25\pm 2^{\circ}\text{C}/\%60\pm 5$ bağıl nem koşulunda 20 ay ve $40\pm 2^{\circ}\text{C}/\%75\pm 5$ bağıl nem koşulunda 6 ay süreyle bekletilerek incelenmiştir. Elde edilen stabilite sonuçları Çizelge 4.28 ve Şekil 4.38’de sunulmuştur. Veriler incelendiğinde geliştirilen optimum formülasyonun $25\pm 2^{\circ}\text{C}/\%60\pm 5$ bağıl nem koşulunda 20 ay, $40\pm 2^{\circ}\text{C}/\%75\pm 5$ bağıl nem koşulunda 6 ay süresince stabil olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.28. In-vitro stabilite çalışması fizikokimyasal sonuçları (Ort. $\pm$ SS)

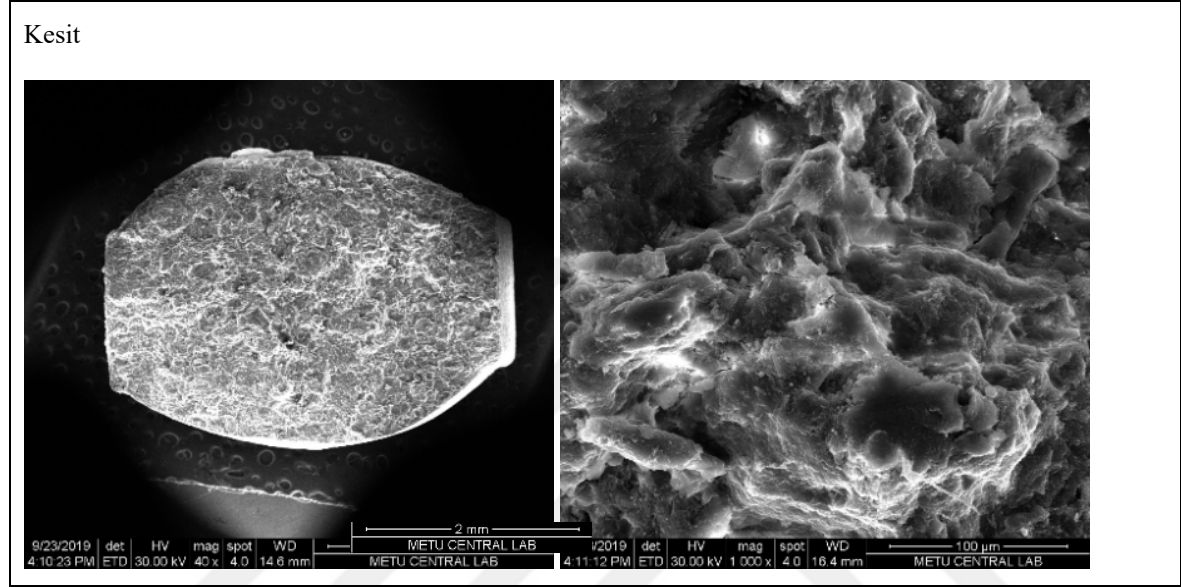
No	Test	T=0	Uzun Dönem Stabilite Testleri			Hızlandırılmış Stabilite Testleri	
			25°C / %60 BN			40°C / %75 BN	
			T=3.Ay	T=6.Ay	T=20.Ay	T=3.Ay	T=6.Ay
1	Görünüş	Beyaz, oblong tablet	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun
2	Tablet En (mm)	16,0 $\pm$ 0,4	16,1 $\pm$ 0,2	16,2 $\pm$ 0,2	16,1 $\pm$ 0,1	16,0 $\pm$ 0,2	16,1 $\pm$ 0,1
3	Tablet Boy (mm)	22,4 $\pm$ 0,3	22,3 $\pm$ 0,2	22,1 $\pm$ 0,1	22,1 $\pm$ 0,1	22,5 $\pm$ 0,5	22,1 $\pm$ 0,3
4	Tablet Kalınlık (mm)	9,8 $\pm$ 0,6	9,8 $\pm$ 0,6	10,1 $\pm$ 0,1	10,1 $\pm$ 0,1	10,0 $\pm$ 0,1	10,1 $\pm$ 0,2
5	Sertlik (kP)	6,8 $\pm$ 0,4	6,5 $\pm$ 0,3	6,6 $\pm$ 0,1	6,6 $\pm$ 0,1	6,3 $\pm$ 0,2	6,4 $\pm$ 0,2
6	Ağırlık (mg)	1334,0 $\pm$ 16,3	1376,3 $\pm$ 10,9	1319,2 $\pm$ 5,5	1319,2 $\pm$ 11,6	1309,9 $\pm$ 7,8	1318,5 $\pm$ 3,8
7	Miktar Tayini (%)	96,5 $\pm$ 1,2	95,5 $\pm$ 0,4	96,2 $\pm$ 0,3	97,1 $\pm$ 1,3	97,7 $\pm$ 0,1	97,9 $\pm$ 1,5



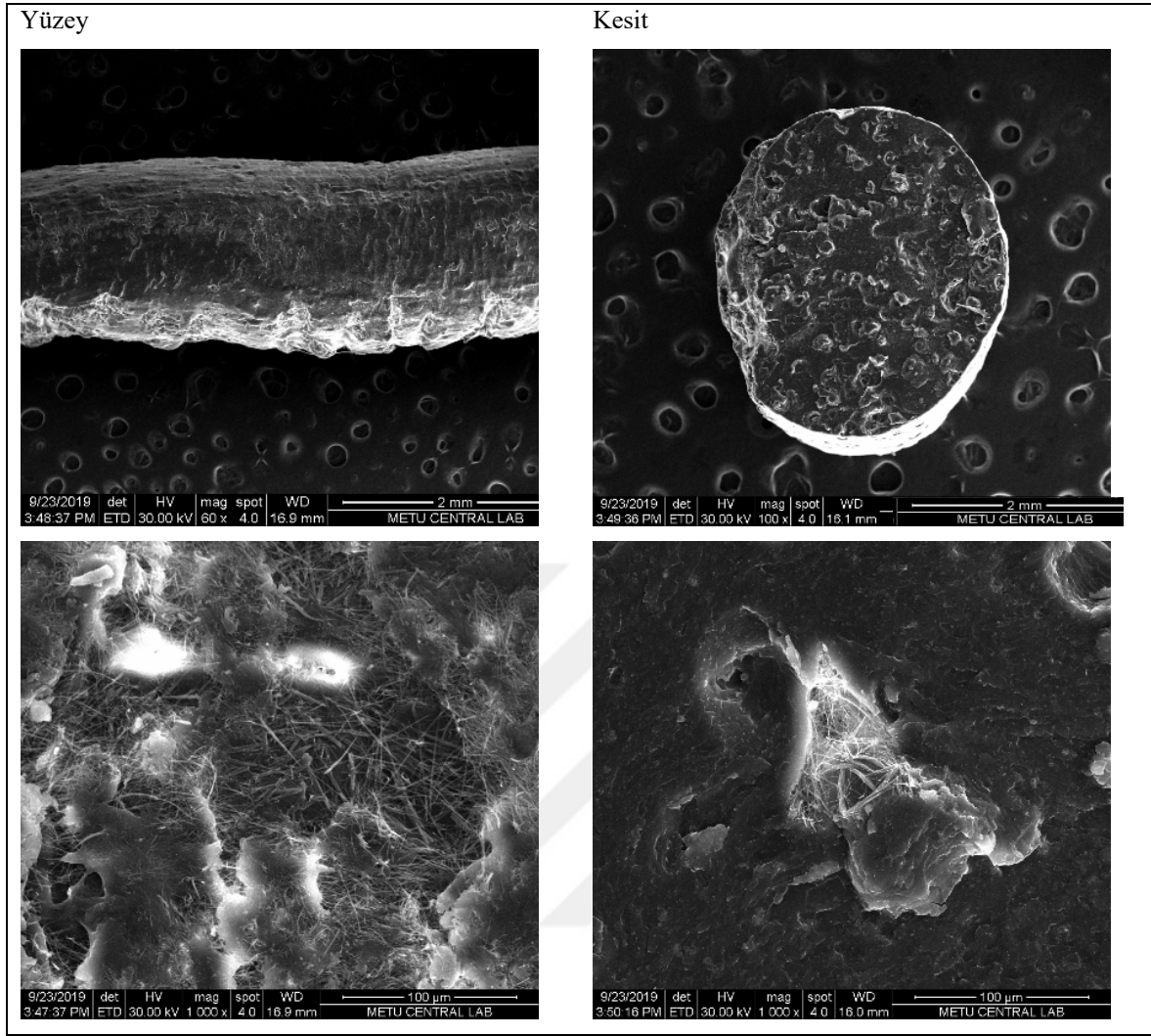
Şekil 4.38. In-vitro stabilite çalışması çözünme sonuçları

4.8.6. Formülasyonların morfolojik özelliklerinin belirlenmesi

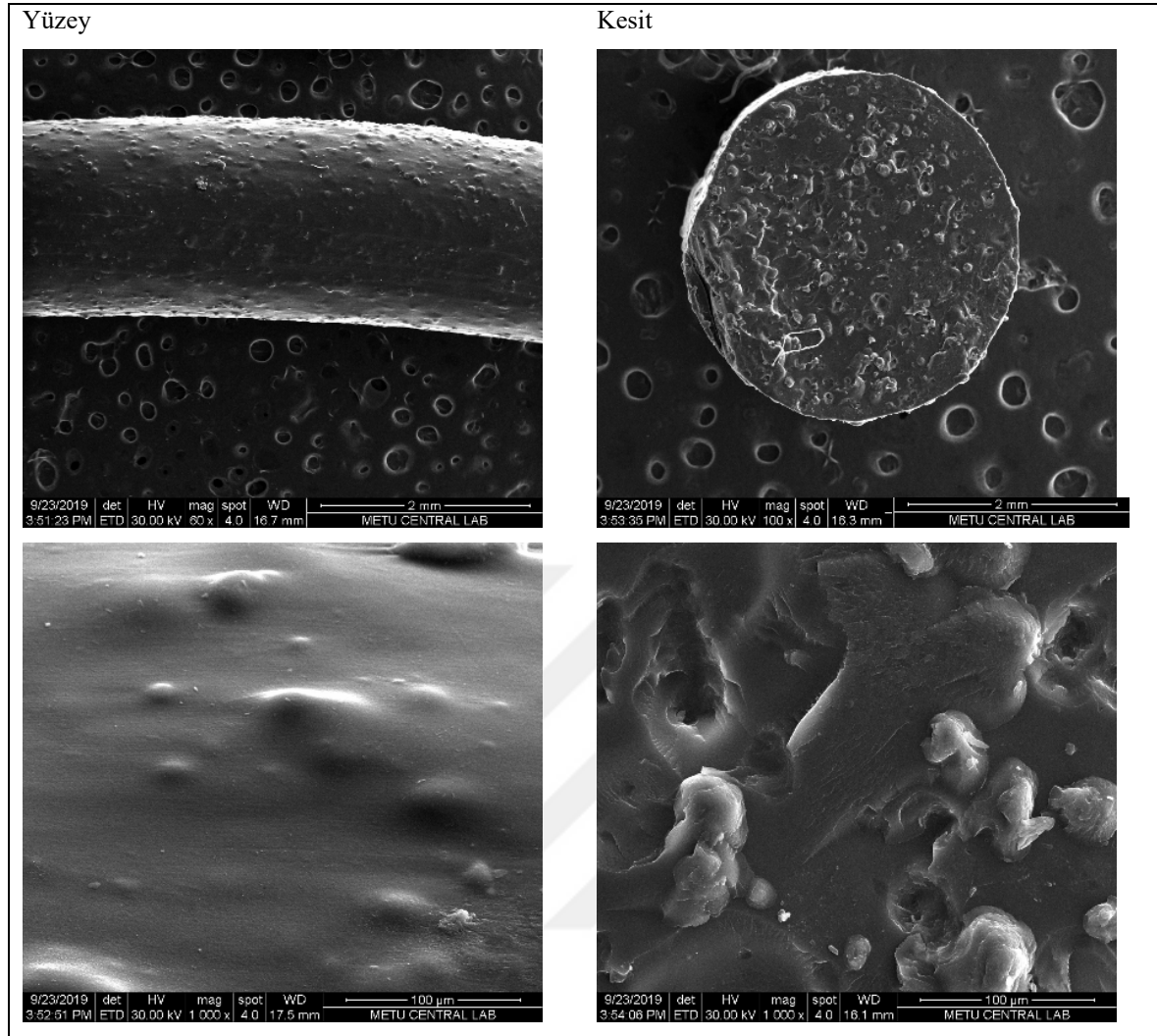
Referans ürün (Inovelon® Film Tablet), Optimum formülasyona ait filament, Optimum formülasyona ait plasebo filament ve Optimum formülasyona ait 3DP tablet (İç dolgu oranları %10, %50 ve %100) için elde edilen SEM görüntüleri Resim 4.1-Resim 4.6’da sunulmuştur.



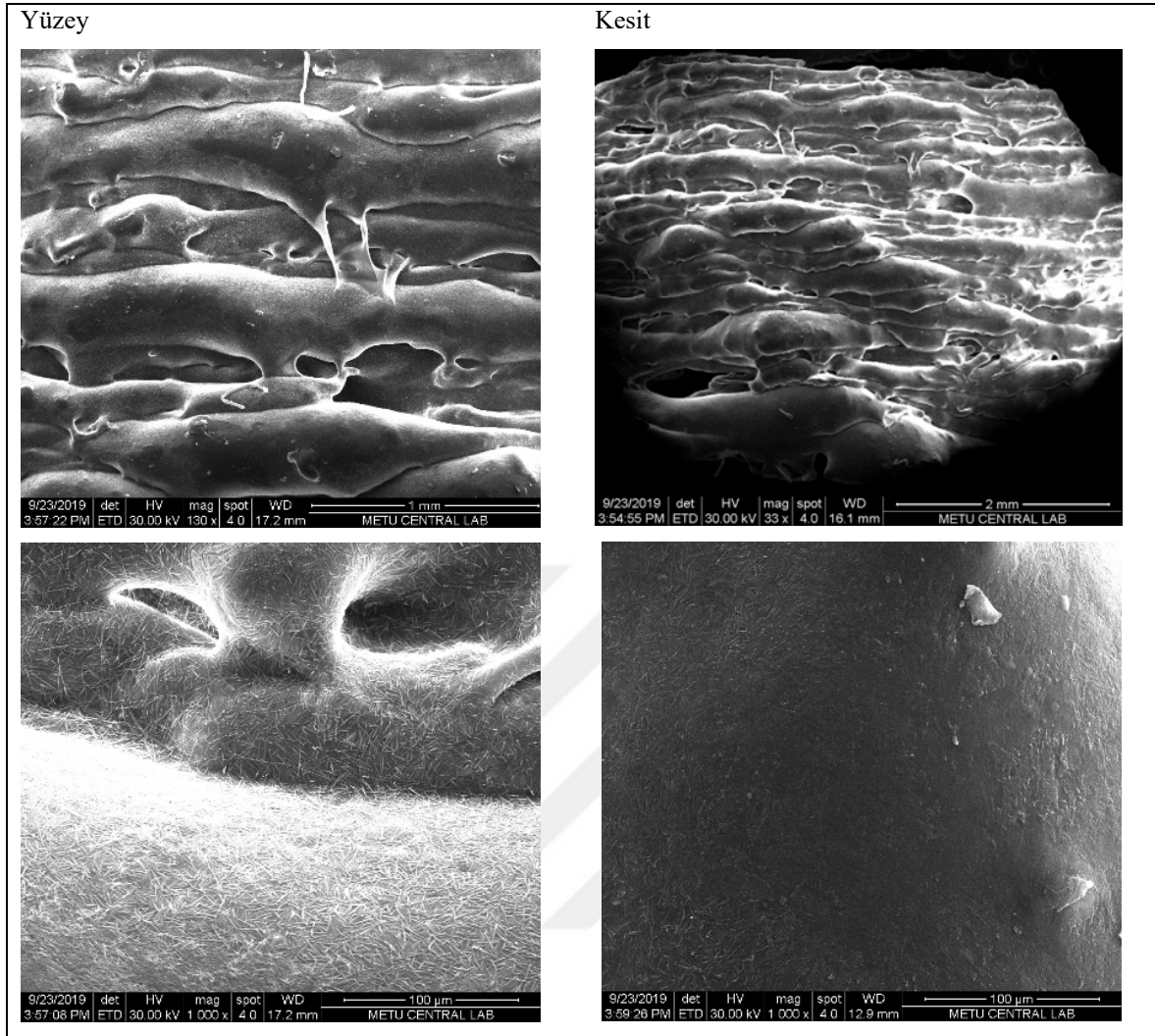
Resim 4.1. Referans ürün (Inovelon® Film Tablet) için elde edilen SEM görüntüleri



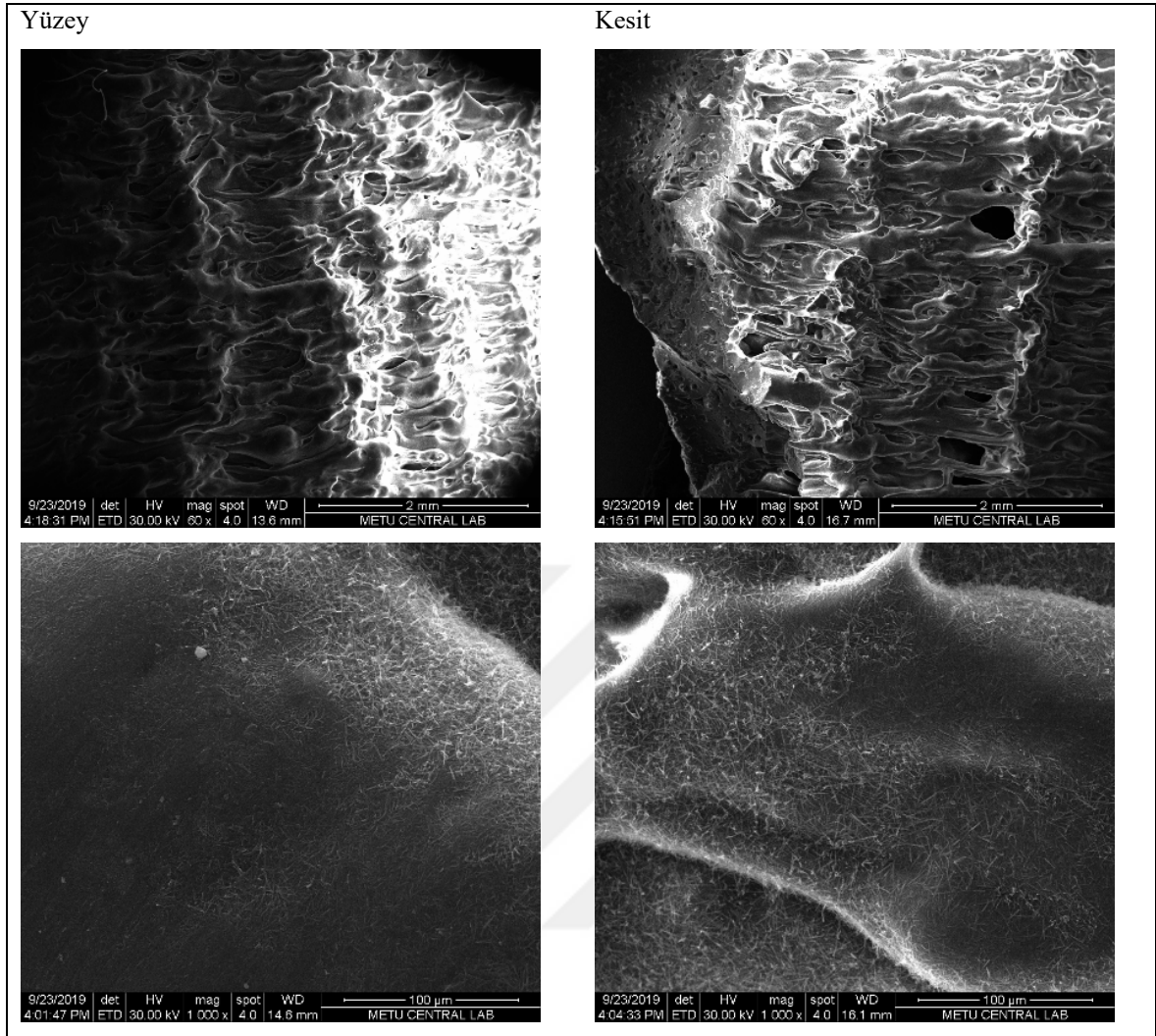
Resim 4.2. Optimum formülasyona ait filament için elde edilen SEM görüntüleri



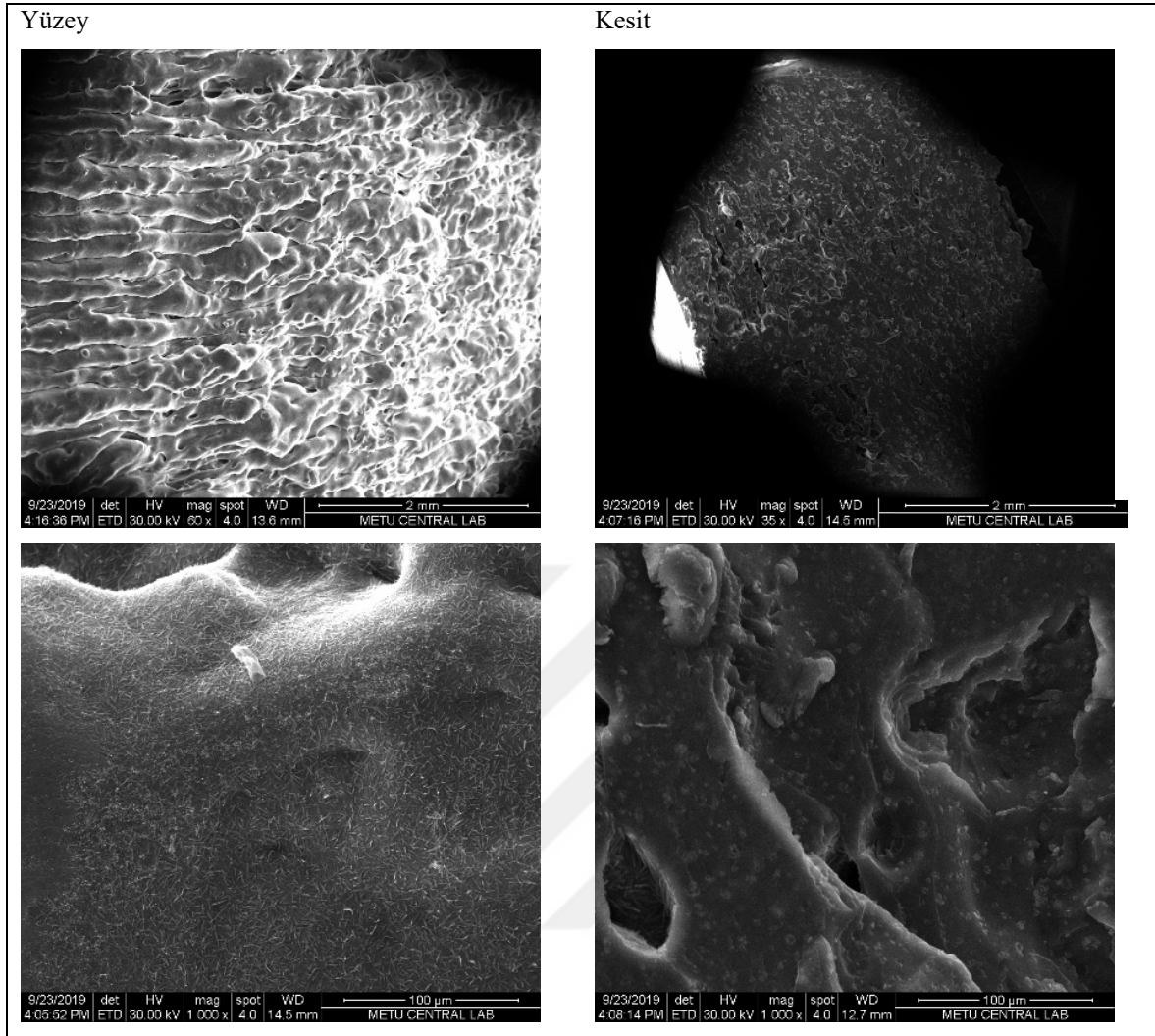
Resim 4.3. Optimum formülasyona ait plasebo filament için elde edilen SEM görüntüleri



Resim 4.4. Optimum formülasyona ait 3DP tablet için elde edilen SEM görüntüleri (İç dolgu oranı: %10)



Resim 4.5. Optimum formülasyona ait 3DP tablet için elde edilen SEM görüntüleri (İç dolgu oranı: %50)



Resim 4.6. Optimum formülasyona ait 3DP tablet için elde edilen SEM görüntüleri (İç dolgu oranı: %100)

4.8.7. Hücre kültürü çalışmaları

Caco-2 ve Hep G2 hücrelerinde rufinamitin sitotoksik etkilerinin MTT testi ile değerlendirilmesi

Rufinamit, referans ürün Inovelon® Film tablet ve Optimum 3DP tablet üzerinde Bölüm 3.3.9’da belirtildiği şekilde gerçekleştirilen MTT testi sonuçları Şekil 4.39 ve Şekil 4.40’ta sunulmuştur.

➤ *Caco-2 hattı sonuçları*

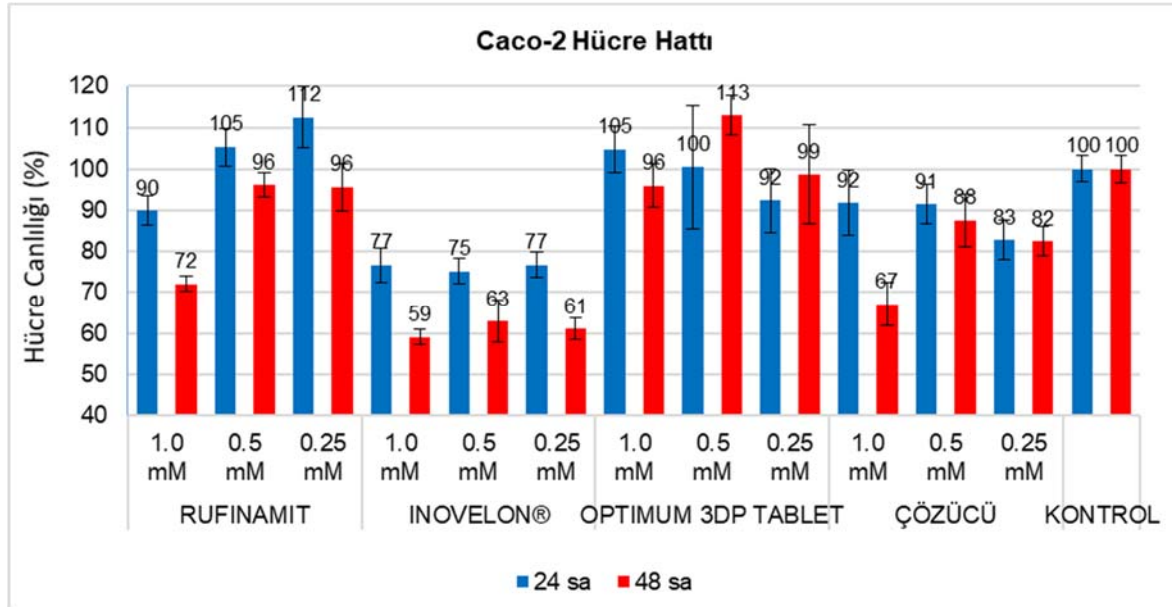
Rufinamit için uygulanan her üç derişimde de 48. saat % hücre canlılığı sonuçları >%50 olarak bulunmuştur (0.25 mM: % 96, 0.5 mM: % 96 ve 1 mM: % 72). 1 mM derişimde hücre canlılığında azalma gözlenmiştir. Bununla birlikte hücre canlılığı oranı her üç derişim için de %50’nin üzerinde olup üç derişimde de sitotoksik olmadığı gözlenmiştir.

Inovelon® Film Tablet için uygulanan her üç derişimde de 48. saat % hücre canlılığı sonuçları >%50 olarak bulunmuştur (0.25 mM: % 61, 0.5 mM: % 63 ve 1 mM: % 59). Derişim artışına bağlı olarak hücre canlılığında hafif bir azalma gözlenmektedir. Bununla birlikte hücre canlılığı oranı her üç derişim için de %50’nin üzerinde olup üç derişimde de sitotoksik olmadığı gözlenmiştir.

Optimum 3DP Tablet (A5-3DP) için uygulanan her üç derişimde de (0.25 mM, 0.5 mM ve 1 mM) 48 saat sonuçları benzer bulunmuş olup hücre canlılığı sırasıyla % 99, %113 ve % 96 olarak hesaplanmıştır. Hücre canlılığı oranı her üç derişim için de %50’nin üzerinde olup üç derişimde de sitotoksik olmadığı gözlenmiştir.

Dolayısıyla rufinamit, Inovelon® ve optimum 3DP tabletin Caco-2 hücreleri üzerinde üç derişimde de sitotoksik olmadığı, ilaveten permeabilite çalışmasının her üç derişimde de hücre canlılığı korunacak şekilde gerçekleştirilebileceği sonucuna varılmıştır.

%100’ün üzerinde elde edilen değerler için standart sapmalarla birlikte deneysel hatalar (örn. pipetaj) ya da hücreye uygulanan maddenin farklı metabolizmaları tetiklemesi veya proliferatif etki göstermesi (örn. mitokondriyel aktivite artışı (Ingels ve diğerleri, 2002)) kaynaklı olabilir. Elde edilen sapma değeri kabul edilebilir seviyededir.



Şekil 4.39. Caco-2 hücrelerinde elde edilen hücre canlılık değerleri

➤ *Hep G2 hattı sonuçları*

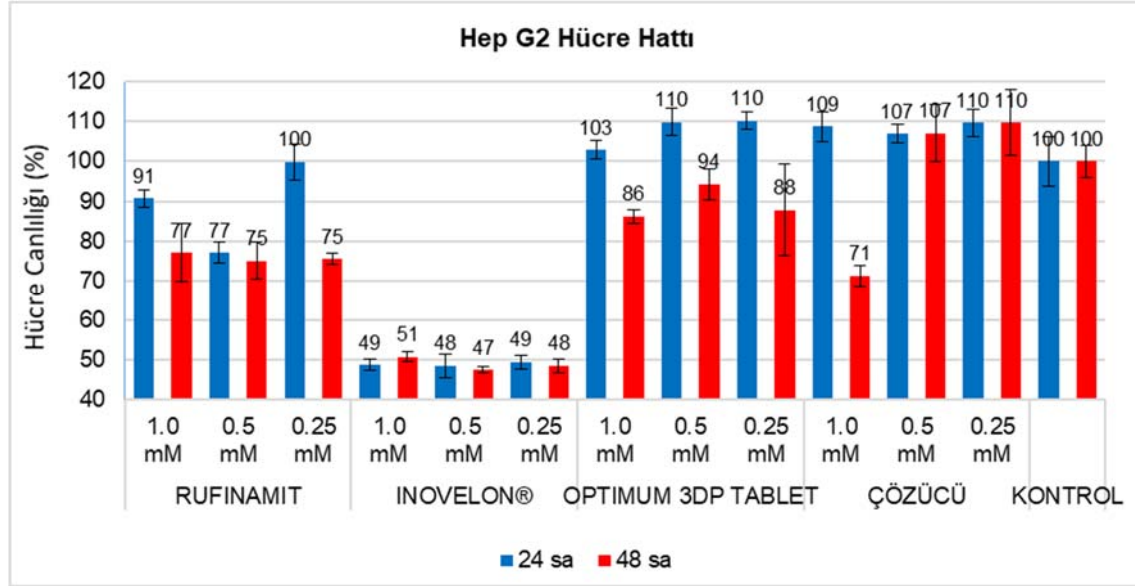
Rufinamit için uygulanan her üç derişimde de 48. saat hücre canlılığı sonuçları benzer >%50 olarak bulunmuştur (0.25 mM: % 75, 0.5 mM: % 75 ve 1 mM: % 77) . Hücre canlılığı oranı her üç derişim için de %50'nin üzerinde olup üç derişimde de hepatik hücreler üzerinde toksik olmadığı gözlenmiştir.

Inovelon® Film Tablet için uygulanan her üç derişimde de 48. saat hücre canlılığı sonuçları benzer ve oldukça düşük bulunmuştur (0.25 mM: % 48, 0.5 mM: %47 ve 1 mM: % 51). Elde edilen bu sonuç Inovelon® Film Tablet'in hepatik hücreler üzerinde toksik olabileceğini göstermektedir.

Optimum 3DP Tablet (A5-3DP) için uygulanan her üç derişimde de 48. saat hücre canlılığı sonuçları oldukça yüksek bulunmuştur (0.25: % 90 mM, 0.5 mM: % 94 ve 1 mM: % 86). Derişim artışına bağlı olarak hücre canlılığında hafif bir azalma gözlenmektedir. Bununla birlikte hücre canlılığı oranı her üç derişim için de %50'nin üzerinde olup üç derişimde de hepatik hücreler üzerinde toksik olmadığı gözlenmiştir.

İlaveten 24 saat ve 48 saat sonunda üç gruptan elde edilen veriler arasında ANOVA testi yapılarak grupların birbirinden farklı olup olmadıkları istatistiksel olarak incelenmiştir

($\alpha:0,05$). Elde edilen sonuçlar, gruplar arasında anlamlı fark olduğunu göstermiştir ($F_{hesap} > F_{kritik}$, $p < 0,05$) (Çizelge 4.29).



Şekil 4.40. Hep G2 hücrelerinde elde edilen hücre canlılık değerleri

Çizelge 4.29. MTT testinde üç grup arasındaki farkın ANOVA ile istatistiksel olarak incelenmesi

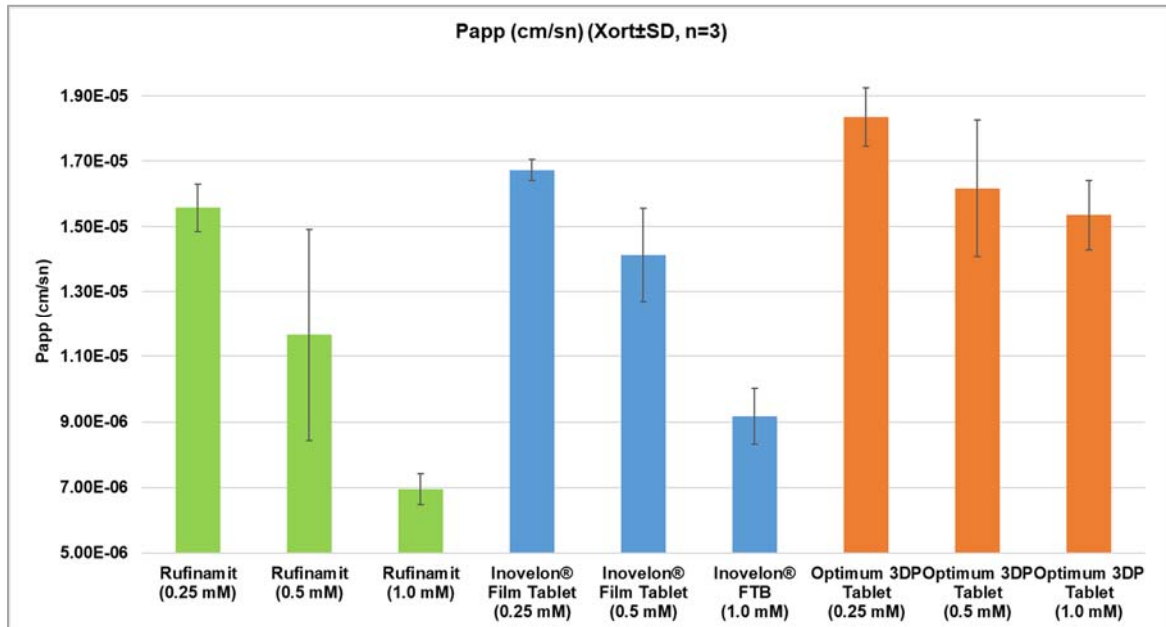
Hücre Hattı	Zaman Noktası	Derişim								
		0,25 mM			0,5 mM			1,0 mM		
		F _{hesap}	F _{kritik}	p	F _{hesap}	F _{kritik}	p	F _{hesap}	F _{kritik}	p
Hep G2	T=24. Saat	673	3,68	0,00	647	3,68	0,00	1143	3,68	0,00
	T=48. Saat	54		0,00	270		0,00	105		0,00
Caco-2	T=24. Saat	46		0,00	18		0,00	57		0,00
	T=48. Saat	43		0,00	200		0,00	187		0,00

Formülasyonların permeabilite deneyleri

Rufinamit, referans ürün Inovelon® Film tablet ve Optimum 3DP tablet üzerinde Bölüm 3.3.9’da belirtildiği şekilde gerçekleştirilen permeabilite testi sonuçları Şekil 4.41’de sunulmuştur. Permeabilite sıralamasında en yüksek permeabilite Optimum 3DP tablet ile elde edilirken en düşük permeabilite değerleri saf etkin madde ile elde edilmiştir.

Literatüre göre test gruplarının permeabilite sınıflandırması Çizelge 4.30’daki gibidir (Akdağ, Gulsun, İzat, Oner ve Sahin, 2020; van Breemen ve Li, 2005; Yee, 1997). Düşük dozlarda üç test grubu için de permeabilite yüksek iken en yüksek dozda (1mM), saf etkin madde ve Inovelon® için “orta” seviyede permeabilite görülmüştür. Bununla birlikte Optimum 3DP tablet için artan çözünürlük sayesinde en yüksek dozda da “yüksek-iyi” permeabilite elde edilmiştir.

İlaveten üç gruptan elde edilen veriler arasında ANOVA testi yapılarak grupların birbirinden farklı olup olmadıkları istatistiksel olarak incelenmiştir ($\alpha:0,05$). Elde edilen sonuçlar, 0.25 mM ve 1 mM derişimlerde gruplar arasında anlamlı fark olduğunu göstermiştir ($F_{hesap} > F_{kritik}$, $p < 0,05$) (Çizelge 4.30).



Şekil 4.41. Caco-2 hücrelerinde elde edilen permeabilite değerleri

Çizelge 4.30. Literatüre göre Papp değerlerine göre permeabilite sınıflandırması

Test Grubu	Doz (mM)	Papp	Perm, Sınıfı
Rufinamit	0,25 mM	$1,56 \cdot 10^{-5}$	Yüksek- İyi
	0,5 mM	$1,17 \cdot 10^{-5}$	Yüksek- İyi
	<u>1 mM</u>	<u>$0,70 \cdot 10^{-5}$</u>	<u>Yüksek-Orta</u>
Inovelon® FTB	0,25 mM	$1,67 \cdot 10^{-5}$	Yüksek- İyi
	0,5 mM	$1,41 \cdot 10^{-5}$	Yüksek- İyi
	<u>1 mM</u>	<u>$0,92 \cdot 10^{-5}$</u>	<u>Yüksek- Orta</u>
Optimum 3DP Tablet	0,25 mM	$1,84 \cdot 10^{-5}$	Yüksek- İyi
	0,5 mM	$1,62 \cdot 10^{-5}$	Yüksek- İyi
	1 mM	$1,54 \cdot 10^{-5}$	<u>Yüksek- İyi</u>

Çizelge 4.31. Permeabilite testi için üç grup arasındaki farkın ANOVA ile istatistiksel olarak incelenmesi

Derişim								
0,25 mM			0,5 mM			1,0 mM		
F _{hesap}	F _{kritik}	p	F _{hesap}	F _{kritik}	p	F _{hesap}	F _{kritik}	p
12,13	5,14	0,01	2,70	5,14	0,15	81,50	5,14	0,00

Referans ürün ve 3DP tablet içerik farkının sitotoksosite ve permeabilite üzerinde etkili olabileceği düşünülmüş ve karşılaştırma tablosu Çizelge 4.31’de sunulmuştur.

Çizelge 4.32. Referans ürün ve 3DP tablet birim formülün kalitatif içeriğinin sitotoksiste ve permeabilite açısından değerlendirilmesi

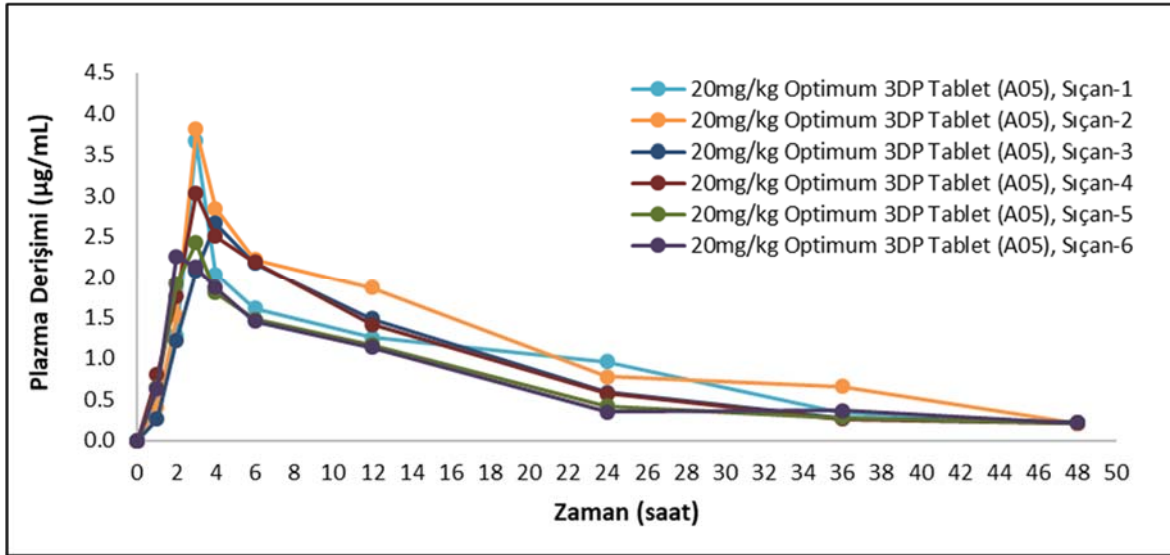
Ham maddeler	Inovelon® FTB	Optimum 3DP Tbt	Sitotoksiste Açısından Değerlendirme	Permeabilite Açısından Değerlendirme
<i>Çekirdek Tablet</i>				
Rufinamit	% 53,5	% 15,0	Çalışmada kullanılan üç grupta da (saf etkin madde, referans ürün ve optimum 3DP tablet), etkin madde olan rufinamitin kullanımı ortaktır. Dolayısıyla sitotoksiste ya da permeabilite üzerinde etkili madde değildir.	
Mikrokristalin selüloz	% 19,6	-	Literatürde sitotoksik olabileceği ile ilgili bir yayın bulunamamıştır. Sodyum stearatın akciğer hücrelerinde toksik olmadığını gösteren bir yayın mevcuttur (Parlati ve diğerleri, 2009). Bununla birlikte çözünürlüğü olmayan yardımcı maddeler olması nedeniyle deney esnasında çökmeye bağlı olarak hücre ölümüne neden olabilir.	Literatürde emilim üzerinde etkili olmadığı belirtilmektedir (Akdağ ve diğerleri, 2020). Bununla birlikte çözünürlüğü olmayan yardımcı maddeler olması nedeniyle deney esnasında çökmeye bağlı olarak hücre ölümüne neden olabilir.
Laktoz	% 10,7	-	Literatürde sitotoksik olabileceği ile ilgili bir yayın bulunamamıştır. İlaveten suda çözünür yardımcı maddelerdir ve çökmeye neden olmayacaktır. Bu nedenle sitotoksik etkiden sorumlu olmadığı düşünülmektedir.	Literatürde emilim üzerinde etkili olmadığı belirtilmektedir (Akdağ ve diğerleri, 2020; Cypotex, 2021). İlaveten suda çözünür bir yardımcı maddedir ve çökmeye neden olmayacaktır.
Sodyum karboksimetil selüloz	% 2,7	-		Nişasta ve selüloz (Akdağ ve diğerleri, 2020) türevlerinin literatürde emilim üzerinde etkili olmadığı belirtilmektedir. İlaveten suda çözünür bir yardımcı maddedir ve çökmeye neden olmayacaktır.
Mısır nişastası	% 5,3	-		
Kolloidal silika anh.	% 0,5	-	Mezoporöz yapıda silika nanopartiküllerinin Hela hücreleri ve astrositler üzerinde formazan kristallerinin ekzositozunu kolaylaştırdığı için sitotoksisteye neden olduğu belirtilmiştir (Fischella ve diğerleri, 2009; Stepanenko ve V.V., 2015). Literatürde Hep G2 hücre hattında süspansiyon olarak kullanılan silikanın sitotoksik olabileceği belirtilmiştir (Wagner ve diğerleri, 2009).	Literatürde emilim üzerinde etkili olmadığı belirtilmektedir (Akdağ ve diğerleri, 2020). Bununla birlikte çözünürlüğü olmayan yardımcı maddeler olması nedeniyle deney esnasında çökmeye bağlı olarak hücre ölümüne neden olabilir.
Sodyum lauril sülfat	% 0,3	-	Uzun alkil zincirli bileşiklerin toksisiteyi artırabileceği literatürde belirtilmektedir (Al-Sheddi ve diğerleri, 2015). SLS, uzun alkil zinciri içeren bir sürfaktandır. Farklı bir yayında SLS'nin sitotoksik olarak değerlendirilebileceği belirtilmektedir (Arechabala, Coiffard, Rivalland, Coiffard ve Y., 1999).	Literatürde SLS'nin Caco-2'de pek çok ilaç için emilimi artırdığı bilinmektedir (Cypotex, 2021). Dolayısıyla referans ürünün saf etkin maddeden daha fazla emilmesinin SLS'ye bağlı olduğu düşünülebilir.

Çizelge 4.32. (devam) Referans ürün ve 3DP tablet birim formülün kalitatif içeriğinin sitotoksiste ve permeabilite açısından değerlendirilmesi

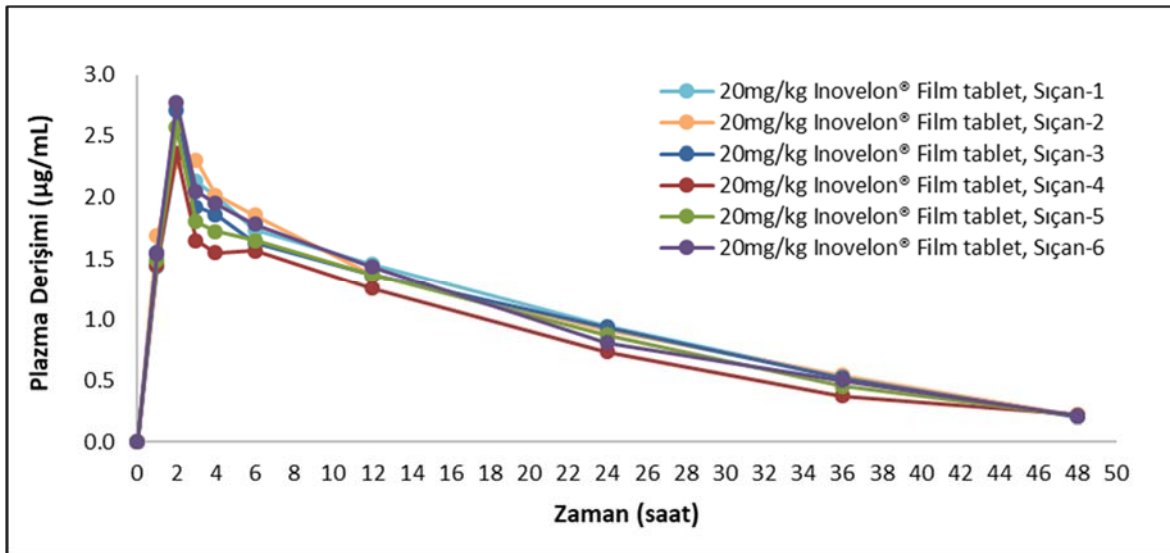
Hammaddeler	Inovelon® FTB	Optimum 3DP Tbt	Sitotoksiste Açısından Değerlendirme	Permeabilite Açısından Değerlendirme
HPMC	% 2,7	% 20,0	Her iki üründe de kullanıldığı için sitotoksiste üzerinde etkisi olduğu düşünülmemektedir.	Literatürde emilim üzerinde etkili olmadığı belirtilmektedir (Akdag ve diğerleri, 2020; Cyprotex, 2021).
Kollidon® VA64	-	% 20,0	Referans üründe kullanılmamaktadır. Optimum formülün sitotoksik olmadığı tespit edildiği için formülasyondaki kullanılan oranların Hep G2 ve Caco-2 hücre hatları üzerinde sitotoksik olmadıkları düşünülebilir.	Literatürde absorpsiyon artırdığı paylaşılmıştır (Yee, 1997). Optimum formülde gözlenen yüksek permeabiliteden sorumlu olduğu düşünülmektedir.
Soluplus®	-	% 34,0		Literatürde emilim üzerinde etkili olduğuna dair bir bilgi bulunamamıştır.
Triasetin	-	% 7,0		Oral biyoyararlanım artırıcı olarak bilinmektedir (Xu ve diğerleri, 2016).
Gelucire® 48/16	-	% 4,0		
<i>Film Kaplama</i>				
HPMC	%1,7	-	Her iki üründe de kullanıldığı için sitotoksiste üzerinde etkisi olduğu düşünülmemektedir.	Literatürde emilim üzerinde etkili olmadığı belirtilmektedir (Akdag ve diğerleri, 2020).
Kırmızı demir oksit	% 0,02	-	Çözünmeyen bir yardımcı maddedir fakat formülasyonda çok düşük oranda bulunduğu için sitotoksiste ya da permeabilite üzerinde etkili olmadığı düşünülmektedir.	
PEG 8000	% 0,3	-	Literatürde sitotoksik olduğuyula ilgili bir bilgiye rastlanamamıştır. İlaveten optimum 3DP formülasyonda kullanılan Soluplus® yardımcı maddesine benzemektedir ve Optimum formülün sitotoksik olmadığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla sitotoksik etkiden sorumlu olmadığı düşünülmektedir.	Literatürde emilim üzerinde etkili olmadığı belirtilmektedir (Akdag ve diğerleri, 2020).
Talk	% 1,2	-	Çözünmeyen bir maddedir. Çökmeye sebep olarak sitotoksik etki göstermiş olabileceği düşünülmektedir.	Literatürde emilim üzerinde etkili olmadığı belirtilmektedir (Akdag ve diğerleri, 2020). Bununla birlikte çözünürlüğü olmayan yardımcı maddeler olması nedeniyle deney esnasında çökmeye bağlı olarak hücre ölümüne neden olabilir.
Titanyum dioksit	% 0,4	-	Çözünmeyen bir maddedir. Farklı hücreler üzerinde sitotoksik olabileceği ile ilgili yayınlar mevcuttur (Chellappa, Anjaneyulu, Manivasagam ve Vijayalakshmi, 2015; Lavicoli, Leso, Fontana ve Bergamaschi, 2011; Wagner ve diğerleri, 2009).	

4.8.8. Ticari ürün Inovelon® film tablet ve optimum 3DP tablet formülasyonları ile yapılan in-vivo çalışmalar

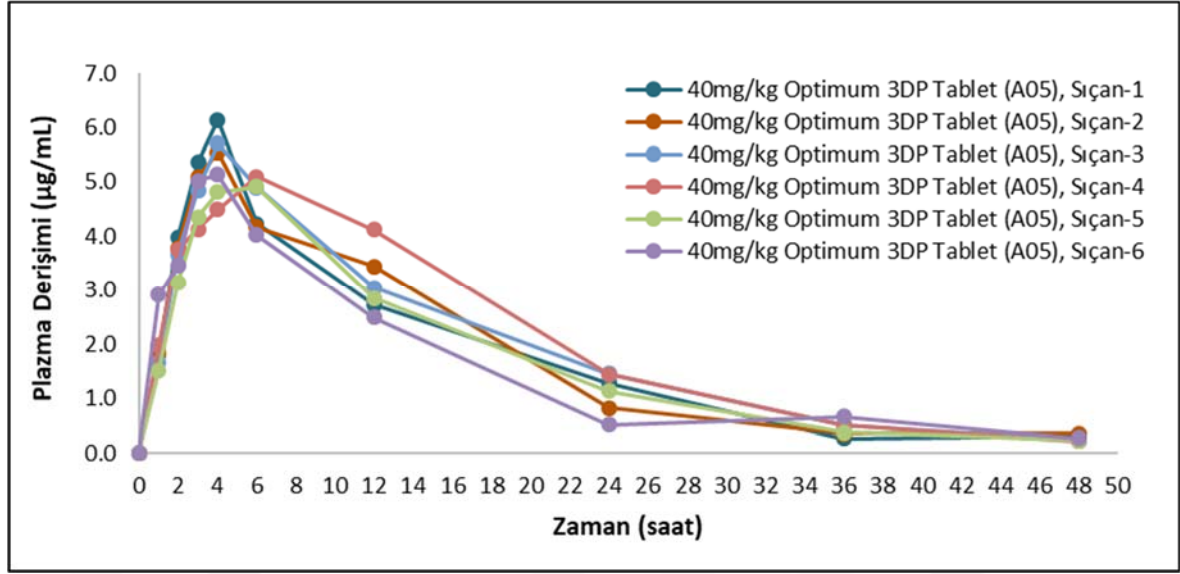
İn-vivo hayvan deneyi çalışmaları Bölüm 3.3.10'da tarif edildiği şekilde gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.42-Şekil 4.47 ve Çizelge 4.32'de sunulmuştur.



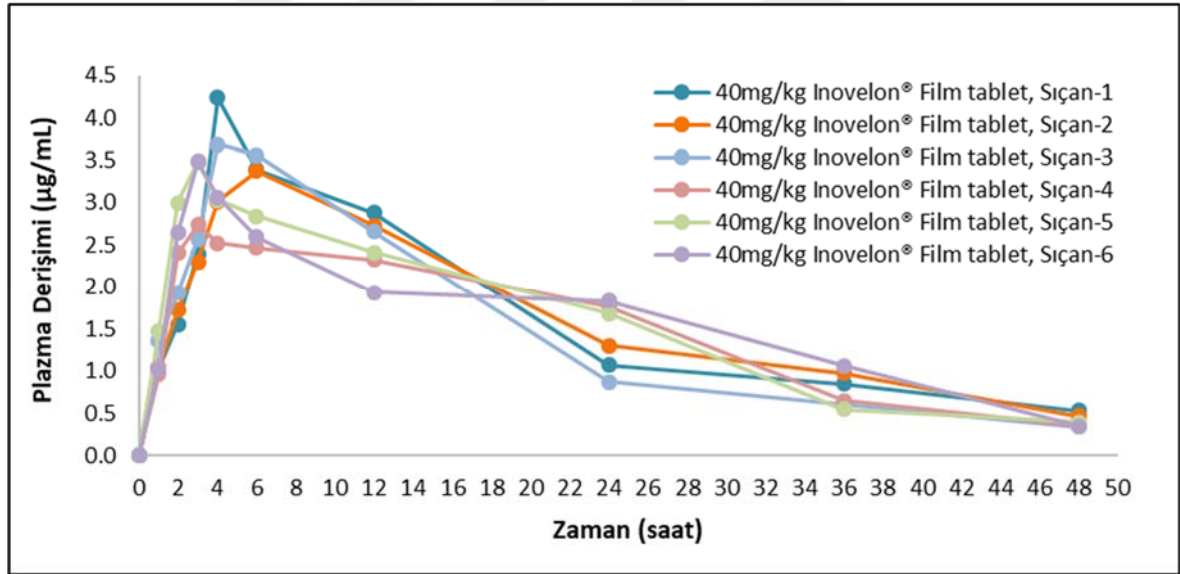
Şekil 4.42. 20 mg /kg dozda rufinamit içeren Optimum 3DP tablet (A05) uygulanan hayvanlardan elde edilen derişim - zaman profilleri (n=6)



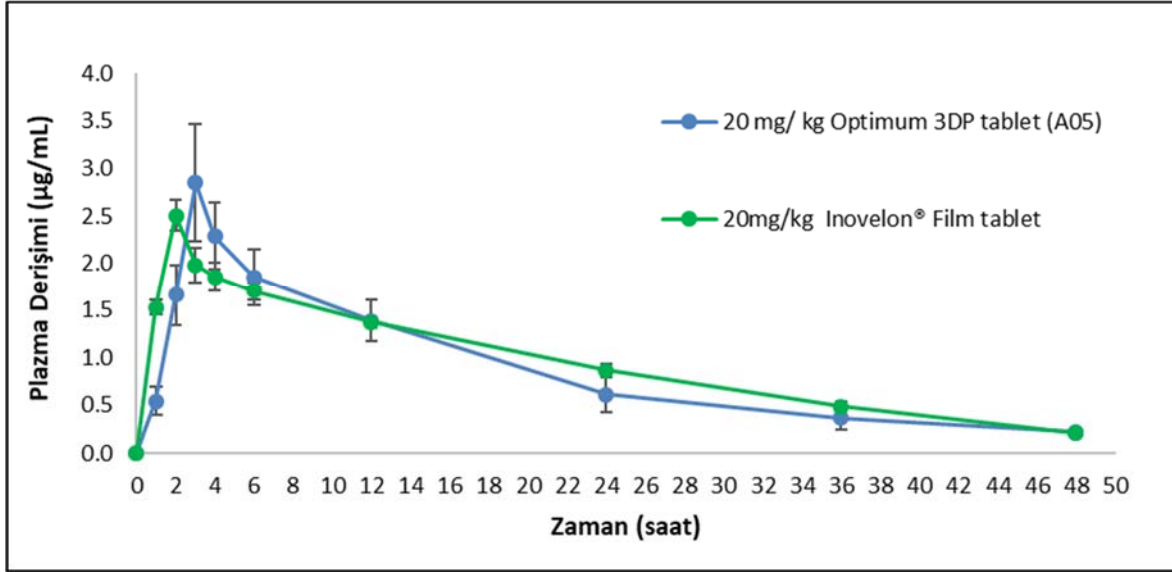
Şekil 4.43. 20 mg /kg dozda rufinamit içeren ticari ürün Inovelon® uygulanan hayvanlardan elde edilen derişim- zaman profilleri (n=6)



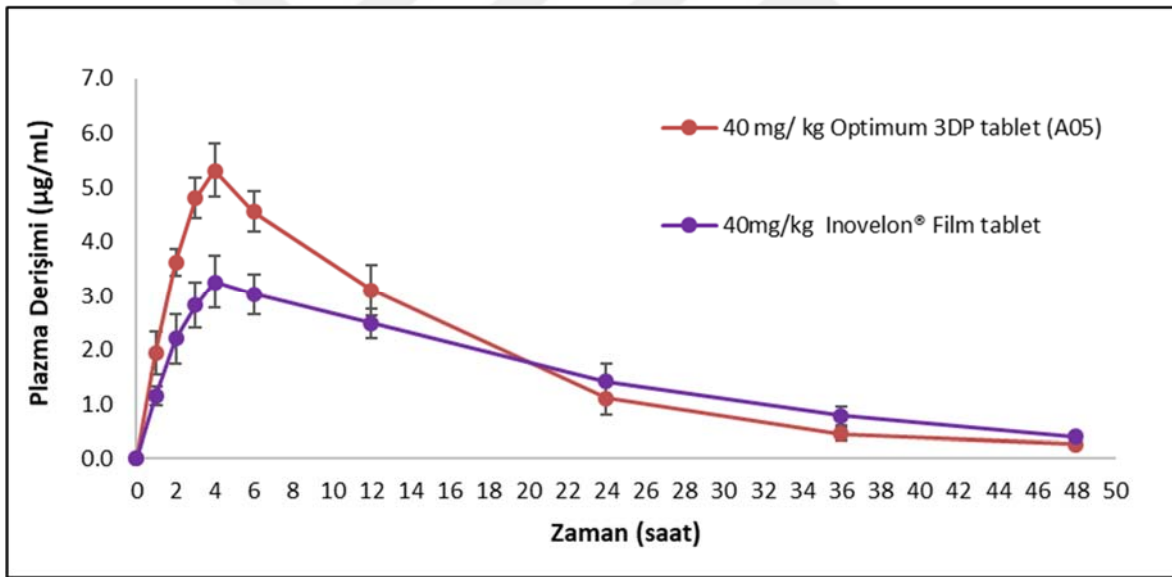
Şekil 4.44. 40 mg /kg dozda rufinamit içeren Optimum 3DP tablet (A05) uygulanan hayvanlardan elde edilen derişim- zaman profilleri (n=6)



Şekil 4.45. 40 mg /kg dozda rufinamit içeren ticari ürün Inovelon® uygulanan hayvanlardan elde edilen derişim- zaman profilleri (n=6)



Şekil 4.46. 20 mg /kg dozda rufinamit içeren ürün uygulanan hayvanlardan elde edilen ortalama derişim- zaman profilleri ($n=6\pm CI$)

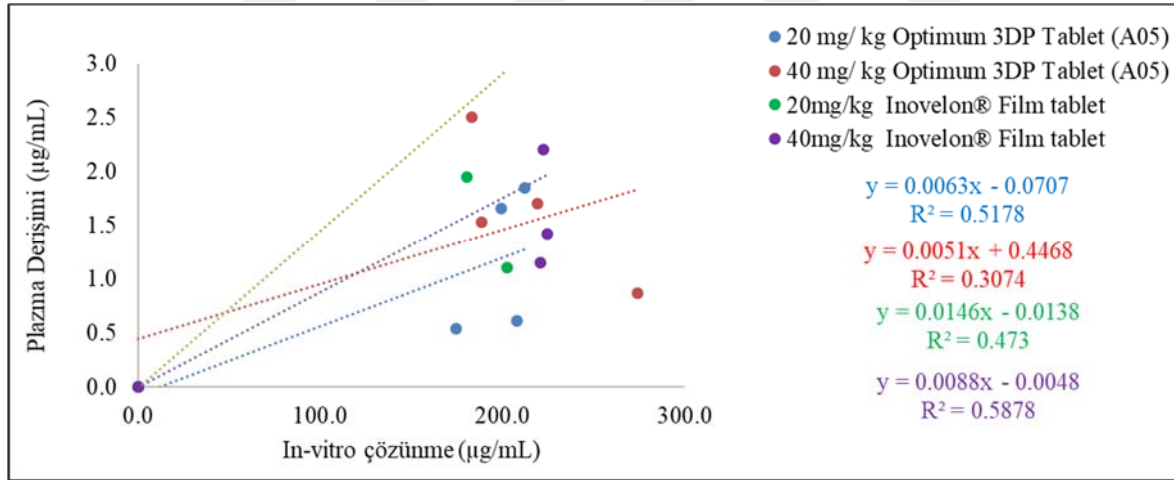


Şekil 4.47. 40 mg /kg dozda rufinamit içeren ürün uygulanan hayvanlardan elde edilen ortalama derişim- zaman profilleri ($n=6\pm CI$)

Çizelge 4.33. Optimum 3DP tablet (A05) ve Inovelon®'a ait farmakokinetik parametreler (n=6±CI)

	Doz: 20 mg/kg		Doz: 40 mg/kg	
	Optimum 3DP Tablet (A05)	Inovelon®	Optimum 3DP Tablet (A05)	Inovelon®
C_{max} (µg/mL)	2,98 ± 0,52	2,50 ± 0,17	5,43 ± 0,37	3,50 ± 0,39
t_{max} (saat)	3,00 ± 0,51	2,17 ± 0,33	4,67 ± 0,83	3,83 ± 0,94
AUC_{0-t} (µg*saat/mL)	40,41 ± 5,91	42,35 ± 4,36	81,38 ± 6,99	72,76 ± 2,81
$AUC_{0-\infty}$ (µg*saat/mL)	44,89 ± 5,93	46,50 ± 4,73	84,35 ± 6,78	80,72 ± 3,67
$t_{1/2}$ (saat)	14,75 ± 3,89	13,08 ± 1,18	9,54 ± 0,61	13,63 ± 2,37
MRT(saat)	21,19 ± 3,00	20,91 ± 0,64	15,19 ± 0,32	22,18 ± 1,02
kd (saat ⁻¹)	0,050 ± 0,010	0,054 ± 0,005	0,073 ± 0,005	0,053 ± 0,010

Elde edilen in-vivo plazma profili ile in-vitro çözünme sonuçları arasında bir ilişki kurulmaya çalışılmış ancak doğrusal bir ilişki tespit edilememiştir (Şekil 4.48).



Şekil 4.48. İn-vivo plazma profili ile in-vitro çözünme ilişkisi

Çizelge 4.34. Farmakokinetik parametreler için Optimum 3DP tablet (A05) ve Inovelon® arasındaki farkın ANOVA ile istatistiksel olarak incelenmesi

Doz: 20 mg/kg							
C_{max} (µg/mL)	Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
	Gruplar Arasında	0,69	1,00	0,69	2,96	0,12	4,96
	Gruplar İçinde	2,33	10,00	0,23	-		
	Toplam	3,01	11,00	-			
T_{max} (saat)	Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
	Gruplar Arasında	2,08	1,00	2,08	7,35	0,02*	4,96
	Gruplar İçinde	2,83	10,00	0,28	-		
	Toplam	4,92	11,00	-			
AUC_{0-∞} (µg*saat/mL)	Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
	Gruplar Arasında	7,82	1,00	7,82	0,17	0,69	4,96
	Gruplar İçinde	449,53	10,00	44,95	-		
	Toplam	457,35	11,00	-			
T_{1/2} (saat)	Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
	Gruplar Arasında	8,38	1,00	8,38	0,65	0,44	4,96
	Gruplar İçinde	129,10	10,00	12,91	-		
	Toplam	137,49	11,00	-			
MRT (saat)	Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
	Gruplar Arasında	0,24	1,00	0,24	0,03	0,86	4,96
	Gruplar İçinde	73,68	10,00	7,37	-		
	Toplam	73,92	11,00	-			
Kd (saat ⁻¹)	Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
	Gruplar Arasında	0,00	1,00	0,00	0,32	0,59	4,96
	Gruplar İçinde	0,00	10,00	0,00	-		
	Toplam	0,00	11,00	-			
Doz: 40 mg/kg							
C_{max} (µg/mL)	Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
	Gruplar Arasında	11,15	1,00	11,15	50,15	0,00*	4,96
	Gruplar İçinde	2,22	10,00	0,22	-		
	Toplam	13,38	11,00	-			
T_{max} (saat)	Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
	Gruplar Arasında	2,08	1,00	2,08	1,71	0,22	4,96
	Gruplar İçinde	12,17	10,00	1,22	-		
	Toplam	14,25	11,00	-			
AUC_{0-∞} (µg*saat/mL)	Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
	Gruplar Arasında	39,60	1,00	39,60	0,85	0,38	4,96
	Gruplar İçinde	463,45	10,00	46,34	-		
	Toplam	503,05	11,00	-			
T_{1/2} (saat)	Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
	Gruplar Arasında	50,28	1,00	50,28	10,70	0,01*	4,96
	Gruplar İçinde	46,98	10,00	4,70	-		
	Toplam	97,26	11,00	-			
MRT (saat)	Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
	Gruplar Arasında	146,61	1,00	146,61	163,66	0,00*	4,96
	Gruplar İçinde	8,96	10,00	0,90	-		
	Toplam	155,57	11,00	-			
Kd (saat ⁻¹)	Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
	Gruplar Arasında	0,00	1,00	0,00	13,03	0,00*	4,96
	Gruplar İçinde	0,00	10,00	0,00	-		
	Toplam	0,00	11,00	-			

*P- değerleri 0,05'ten küçük olan terimler istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.



5. TARTIŞMA

Bu bölümde tez kapsamında yapılan deneysel çalışmaların sonuçları değerlendirilmiştir. Bu amaçla etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri karakterize edilmiştir. Miktar tayini için geliştirilen HPLC ve LC-MS yöntemlerinin analitik metot validasyonu değerlendirilmiştir. Referans ürün karakterizasyonu yapılmış, formülasyon gelişimi çalışmaları öncesinde risk analizi gerçekleştirilmiş ve bu doğrultuda optimum formülasyonun eldesi için gerçekleştirilen formülasyon çalışmaları tartışılmıştır. Etkin madde içeren formülasyonlara ait stabilite çalışmalarının ve hücre kültürü deneylerinin sonuçları incelenmiştir. Ayrıca geliştirilen 3DP formülasyon ve ticari ürünün sıçanlar üzerindeki farmakokinetik etkisi karşılaştırılmıştır.

5.1. Ön Formülasyon Çalışmaları

Etkin madde rufinamitin saflığının ve formülasyonlarda değişmeden kaldığının gösterilmesi için formülasyon çalışmalarına başlamadan önce fizikokimyasal özellikleri incelenmiştir. Bu amaçla gerçekleştirilen çalışmalar, denge çözünürlük tayini, DSC ile erime derecesi tayini, XRD ile kristal modifikasyonu tayini, FTIR analizi, partikül büyüklüğü analizi, toz akış özelliklerinin belirlenmesi, kütle spektrumu ve UV spektrumudur.

5.1.1. Rufinamitin denge çözünürlük tayini

Rufinamitin saf sudaki denge çözünürlük değeri 54,7 mg/L olarak bulunmuş olup literatür ile uyumludur (Ravish ve Dhara, 2013). Rufinamit non-iyonik bir bileşik olduğu için beklenildiği gibi 0,1 N HCl, pH 4,5 asetat tamponu ve pH 6,8 fosfat tamponunda yapılan denge çözünürlük verileri de birbirine benzer bulunmuştur (sırasıyla 54,1 mg/L, 56,1 mg/L ve 57,0 mg/L). Elde edilen bu veriler Avrupa farmakopesi “General Notices” bölümüne göre etkin maddenin suda, 0,1 N HCl’de, pH 4,5 asetat tamponunda ve pH 6,8 fosfat tamponunda pratik olarak çözünmediğini göstermektedir.

Diğer yandan çözünürlük değerinin çözünme ortamındaki SLS oranına bağlı olduğu gözlenmiştir. Çözünme ortamına % 2 SLS eklenmesi ile çözünürlük değerinin 671.6 mg/L olarak denge çözünürlük değerinde yaklaşık on kat artışa neden olduğu görülmüştür.

Elde edilen bu bulgunun, SLS'nin yüzey aktif özelliği ve miseller çözünürlük nedeniyle olabileceği düşünülmüştür. Çözünme ortamına eklenen SLS ile yüzey gerilim düşmektedir. Bu sayede rufinamitin ıslanabilirliği artarak çözünürlük artmaktadır. İlâveten çözünme ortamına yüzey etkin maddelerin kritik misel derişiminin üzerinde ilavesi sonucu miseller çözünürlük ile çözünürlük artırılması literatürde sıklıkla uygulanan bir yöntemdir (Jain, Ran ve Yalkowsky, 2004; Shekunov, 2017). Özellikle suda çözünürlüğü düşük olan etkin maddeler için çözünürlük ve çözünme ortamına SLS eklenmesi ile miseller çözünürlük sağlanmaktadır (Alizadeh, Shayanfar ve Jouyban, 2018; Crison, Weiner ve Amidon, 1997). SLS oranındaki artışa bağlı olarak etkin maddelerin çözünürlüğünün miselizasyon ile arttığına dair literatürde çalışmalar mevcuttur (Bahr, Modi, Patel, Campbell ve Stockdale, 2019).

SLS maddesi için kritik misel derişimi yaklaşık %0,2 (8.3 mM) 'dir (Jain ve diğerleri, 2004; USP, 2021b) ve bu oran çözünme ve çözünürlük ortamlarında kullanılan %2 (69.4 mM) oranının oldukça altındadır. Dolayısıyla hem çözünürlük hem de çözünme ortamlarında kullanılan SLS oranında miseller çözünürlük aracılığıyla rufinamitin çözünürlüğü artmaktadır.

Gerçekleştirilen çözünürlük çalışması sonuçları etkin maddenin çözünürlüğünün pH'tan bağımsız ve sürfaktana bağımlı olduğunu göstermekle birlikte, formülasyon geliştirme çalışmalarında kullanılan çözünme ortamlarında sink koşulun denetlenmesinde de kullanılmaktadır. Sink koşulun sağlanması için etkin maddenin çözünürlüğünün, çözünme ortamındaki maksimum derişiminin en az 3-5 katı olması gereklidir (Liu, 2013; Siepmann ve Siepmann, 2020). Bu doğrultuda 200 mg etkin madde için sink koşulun sağlanabildiği ortamların “% 2 SLS (a/h)” içermesi gerektiği tespit edilmiştir. FDA ilâç salım metotları veri tabanında kullanılan SLS oranı %0,05 ile %3 arasında değişmektedir (FDA, 2021). 200 mg'ın üzerinde dozlarla sink koşulda çalışmak için daha yüksek SLS derişimlerinin gerekli olduğu düşünülmektedir.

5.1.2. Rufinamitin erime derecesi tayini

Erime derecesi, maddelerin saflığını da gösteren her maddeye özgü bir özelliktir. DSC termogramında rufinamitin erime noktası 238°C'dir (Şekil 4.1) ve bu değerin literatür ile

uyumlu olduğu bulunmuştur (EMA, 2007; Portman, Hoffmeier, Burkhard, Scherrer ve Szelagiewicz, 2011).

5.1.3. Rufinamitin kristal modifikasyonunun incelenmesi

Rufinamit polimorfizm gösterir. A, A', B ve C kristal modifikasyonları Amerikan patent ofisinden yayımlanmış US8076362 B2 (Portman, Hoffmeier, Burkhard, Scherrer ve Szelagiewicz, 2011), US 6740669 B1 (Portman, Hoffmeier, Burkhard, Sherrer ve Szelagiewicz, 2004) ve US 7750028 B2 (Portman, Hofmeier, Burkhard, Scherrer ve szelagiewicz, 2010) patentlerinde tarif edilmiştir. Özellikle A ve A' kristal modifikasyonları, yüksek stabiliteye sahip ve farmasötik etkin madde olmasını sağlamaktadır (Portman ve diğerleri, 2011; Portman ve diğerleri, 2004; Portman ve diğerleri, 2010). Rufinamitin kristal yapısı, XRD difraktogramı üzerinden incelendiğinde, referans ürün olan Inovelon® ile aynı spesifik piklere sahip olduğu gözlenmiştir. Özellikle referans ürün patentinde belirtilen “çok güçlü” ve “güçlü” düzlemler arası boşluk değerleri (d) olan 4.84° , 4.55° ve 3.25° pikleri net bir şekilde gözlenebilmiştir. Elde edilen bu bulgu rufinamitin polimorfik yapısının, etkinlikten sorumlu polimorf olan A-polimorfu (*Modification A*) olduğunu göstermiştir (Portman, Hoffmeier, Burkhard, Sherrer ve Szelagiewicz, 2004a).

5.1.4. Rufinamitin FTIR analizi

FTIR spektrumu sonucunda 1396 cm^{-1} , 1474 cm^{-1} ve 3412 cm^{-1} 'de gözlenen amin gerilim bandı ($-\text{NH}_2$), 1632 cm^{-1} 'de gözlenen karbonil grubu ($\text{C}=\text{O}$) gerilim bandı ve 3096 cm^{-1} ve 3184 cm^{-1} 'de gözlenen “ $=\text{C}-\text{H}$ bağı” belirlenmiştir. Bu sonuçların literatür verileri ile benzer olduğu görülmüştür (Wandera, 2013).

5.1.5. Rufinamitin partikül büyüklüğü dağılımının ölçülmesi

Etkin maddenin fiziksel karakterizasyonu için rufinamitin partikül büyüklüğü dağılımı analizi yapılmış ve partikül büyüklüğü dağılımı d (0,1): $2,609\text{ }\mu\text{m} \pm 0,165$, d (0,5): $7,615\text{ }\mu\text{m} \pm 0,183$ ve d (0,9): $15,536\text{ }\mu\text{m} \pm 0,539$ olarak bulunmuştur ($n=3\pm\text{SS}$). Elde edilen veriler etkin maddenin çok ince yapıda ve elektrostatik özellikte olduğunu ve bu sebeple tabletler halinde üretilmesi için granülasyon gibi ilave işlemlerin gerektirdiğini göstermiştir. Nitekim

referans ürün olan Inovelon[®] film tablet üretim prosesi art arda iki ayrı yaş granülasyon prosesini içeren oldukça uzun bir prosestir (EMA, 2007).

5.1.6. Rufinamitin toz akış özelliklerinin belirlenmesi

Rufinamitin toz akış özellikleri Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Rufinamitin küme dansitesi $0.11 \text{ g/mL} \pm 0.01$, sıkıştırılmış dansitesi $0.20 \text{ g/mL} \pm 0.01$, basılabilme indeksi 44 ± 6 , Hausner oranı 1.80 ± 0.18 ve yığın açısı $72^\circ \pm 2$ olarak bulunmuştur ($n=3$, Ort. $\pm$ SS).

Avrupa Farmakopesi “<2.9.6> Powder flow” monografında “Table 2.9.36.1 – *Flow properties and corresponding angle of repose*” tablosuna göre yığın açısı $> 66^\circ$ olan tozlar akış özelliği açısından “çok çok zayıf” sınıfına girmektedir (Ph.Eur., 2020). Rufinamit için elde edilen değer $72^\circ \pm 2$ ($> 66^\circ$) olarak bulunmuş olup bu nedenle akış özelliği “çok çok zayıf” sınıfındadır.

Benzer şekilde yine Avrupa Farmakopesi “<2.9.6> Powder flow” monografında “Table 2.9.36.-2. – *Scale of flowability*” tablosuna göre basılabilme indeksi > 38 ve Hausner oranı $> 1,60$ olan tozlar akış özelliği açısından “çok çok zayıf” sınıfına girmektedir (Ph.Eur., 2020). Rufinamit için elde edilen değer basılabilme indeksi 44 ± 6 (> 38) ve Hausner oranı $1,80 \pm 0,18$ ($> 1,60$) olarak bulunmuştur. Elde edilen bu verilere göre rufinamitin akış özelliği “çok çok zayıf” sınıfındadır.

Elde edilen bu veriler etkin maddenin oldukça düşük dansiteli olduğunu, basılabilirliğinin ve akış karakteristiğinin tabletler halinde basılabilmesi için çok yetersiz olduğunu, bu nedenle katı ilaç şekli haline gelebilmesi için granülasyon gibi ilave üretim işlemlerinden geçmesi gerektirdiğini göstermektedir. Nitekim referans ürün olan Inovelon[®] film tablet üretim prosesi art arda iki ayrı yaş granülasyon prosesini içeren oldukça uzun bir prosestir (EMA, 2007).

Tez çalışması kapsamında geliştirilen 3DP tablet baskı yöntemi, basılabilirlik özellikleri oldukça düşük rufinamit etkin maddesi için hızlı bir proses ile tabletler halinde bitmiş ürün elde edilmesini mümkün kılmıştır.

5.1.7. Rufinamitin kütle spektrumu

Rufinamitin molekül ağırlığı 238 g/mol olarak bulunmuştur. Elde edilen bu veri literatür ile uyumludur (EMA, 2007).

5.1.8. Rufinamitin UV spektrumu

Rufinamitin ACN:MeOH:Su (40:50:10) içerisindeki maksimum absorbans gösterdiği dalga boyunun belirlenmesi çalışmaları sonucunda maksimum absorbans verdiği dalga boyunun (λ_{max}) 207 nm olduğu görülmüştür. Bu sonuç literatür verileri ile uyumludur (Annapurna, Goutam, Saketha ve Pavani, 2012; Harisudha ve diğerleri, 2013).

5.2. Rufinamitin Miktar Tayini Yöntemlerinin Geliştirilmesi ve Validasyonu

Rufinamitin hem in-vitro, hem de in-vivo miktar tayini analizlerinde kullanılan analitik yöntemler, ICH (EMA, 1995) ve FDA (FDA, 2018) kılavuzlarına uygun olarak ayrı ayrı valide edilmiş ve analizlerdeki kullanımının güvenilirliği ispatlanmıştır.

5.2.1. Miktar tayini yöntemi (Yöntem 1) validasyonu

Yöntem 1 için validasyon çalışmaları rufinamitin % 2 SLS içeren saf su çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Rufinamitin 3DP tablet formülasyonundaki miktar tayini, çözünme tayini, çözünürlük tayini, stabilite tayini, hücre kültürü çalışmalarındaki miktar tayini ve ekstrüzyon temizlik yöntemi gelişimi çalışmalarında kullanılmıştır. Miktar tayini HPLC aleti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan analitik yöntemin kabul edilebilirliğini ispat eden validasyon parametrelerinden, doğrusallık, aralık, doğruluk, geri elde, kesinlik, özgünlük, seçicilik, filtre etkisi, teşhis ve tayin sınırı, yöntem sağlamlığı ve stabilite parametreleri incelenmiştir.

Doğrusallık, bir analitik yöntemin deney bulgularının örnek içindeki madde derişimi ile belirli bir aralıkta orantılı olmasıdır. Gerçekleştirilen validasyon çalışmasında rufinamitin 0,02-0,29 mg/mL aralığında derişimlerin pik alanı cevapları ile ilişkisinin doğrusal olduğu bulunmuştur ($r^2=0,999$) (Şekil 4.7). İlâveten doğrusallık çalışmasının en alt ve en üst derişimlerin %RSD değerleri de incelenmiş olup en alt ve en üst derişimlerdeki %RSD

değerinin %2'nin altında olduğu, dolayısıyla yöntemin bu derişim aralığında tekrar edilebilir sonuçlar verdiği ve doğrusal olduğu gösterilmiştir.

Doğruluk kullanılan analitik yöntem ile elde edilen deney sonuçlarının gerçek değerlere yakınlığını ifade eder. Geri kazanım çalışmaları ile yöntem doğruluğu gösterilir. Geri kazanım % 95-105 arasında değişirken varyasyon katsayısı % 2'den küçük bulunmuştur (Çizelge 4.4).

Kesinlik analitik yöntemin birbirini takip eden ölçümleri arasındaki yakınlığın derecesi olup normal deney koşulları altında analitik yöntemin tekrar elde edilebilirlik ve tekrarlanabilirlik derecesinin bir ölçüsüdür. Deney içi ve deneyler arası kesinlik sonuçları Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6'da verilmiştir. Deney içi ve deneyler arası kesinlik deneylerinin varyasyon katsayıları % 2'den küçüktür. Deneyler arası kesinlik çalışmasında sonuçlar arası fark %2'den küçüktür. Bu veriler rufinamit için yöntemin tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir.

Özgünlük ve seçicilik parametresinin testinde, kullanılan analiz yönteminin sadece analiz etmek istenilen maddeyi saptayabildiğinin, çözücü ve plasebonun aynı dalga boyunda absorbans gösterip göstermediğinin kontrolü yapılmıştır. Elde edilen kromatogramlar incelendiğinde, çözücü ve plasebo çözeltilerinin etkin maddeye ait pik içermediği, dolayısıyla yöntemin rufinamite özgün olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.8-Şekil 4.11).

Hazırlanan numunelerin HPLC sisteminde tıkanmalara yol açmaması amacıyla gerçekleştirilen filtrasyon çalışmasında kullanılan filtrenin tespiti amacıyla test çözeltisi, standart çözeltisi, çözücü (blank) ve plasebo çözeltileri analitik yöntemdeki gibi hazırlanmış, bu çözeltilerin bir miktarı santrifüj edilmiş ve üst faz farklı filtre tipleri ile süzülerek viallere alınarak analiz edilmiş ve % fark hesaplanmıştır. Tüm filtre tiplerinde blank ve plasebo çözeltilerinde etkin madde piki alıkonma zamanında herhangi bir pik gözlenmemiştir. Test ve standart çözeltilerinde denenen tüm filtrelerde % fark değeri %1'in altında ve uygun bulunmuştur (Çizelge 4.7).

Geliştirilen analitik yöntemin teşhis ve tayin sınırı (LOD ve LOQ) hesaplanmıştır. Analitik yöntemin LOD değeri 0,0010 mg/mL, LOQ değeri 0,0031 mg/mL olarak bulunmuştur.

Çözünme analizleri formülasyon gelişimi çalışmasında yol gösteren çok önemli analizlerdir. Sağlam bir yöntem ile analizlerin gerçekleştirilmesi, yapılan formülasyon gelişimi çalışmalarını daha doğru değerlendirilmesine ve yönlendirilmesine imkân sağlar. Bu nedenle validasyon çalışmasının sağlamlık parametresinde istatistiksel merkezi tekrarlı (CCD, central composite design) deney tasarımı kullanılarak yöntem aydınlatılmıştır. Analitik yöntem parametrelerinin ufak değişikliklere karşı sağlamlığı, istatistiksel merkezi tekrarlı (CCD, central composite design) deney tasarımı kullanılarak incelenmiştir. Yapılan istatistiksel hesaplar sonucunda, sistem uygunluk kriterlerinin elde edilebileceği matematiksel eşitlikler ve hedef sistem uygunluk kriterlerinin elde edilebileceği tasarım alanı oluşturulmuştur (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.12). Oluşturulan bu tasarım alanı, metot üzerinde en etkili parametrenin “mobil faz akış hızı” olduğunu göstermiştir.

Analitik yöntemde kullanılan test ve standart çözeltileri ile yöntemde kullanılan mobil fazın ne kadar süre stabil olduğunun tespiti amacıyla rufinamitin %2 Sodyum lauril sülfat içeren saf su çözeltisinde 0,24 mg/mL’lik (% 100) derişimdeki test ve standart çözeltileri belirli süre bekletilip belli aralıklarla analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, mobil faz, test ve standart çözeltilerinin en az 15 saat stabil olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.11).

5.2.2. Miktar tayini yöntemi (Yöntem 2) validasyonu

Rufinamitin in-vivo deneylerde, sıçan plazmasından miktar tayininde kullanılan biyoanalitik miktar tayini yöntemi, FDA tarafından yayımlanan biyoanalitik yöntem validasyonu kılavuzuna uygun olarak valide edilmiştir (FDA, 2018). Bu kapsamda biyoanalitik yöntemin kabul edilebilirliğini gösteren validasyon parametrelerinden doğrusallık, doğruluk, ekstraksiyon etkinliği, kesinlik, özgünlük, seçicilik, teşhis ve tayin sınırı ve çözelti stabilitesi incelenmiştir.

Doğrusallık için 0,015 µg/mL-6 µg/mL aralığında rufinamit derişimi ile ortalama pik alanları arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu gösterilmiştir (r^2 : 0,9991) (Şekil 4.13).

Doğrusallık ve ekstraksiyon etkinliğinin (geri elde) % 101-103 arasında olduğu görülmüş ve varyasyon katsayısı % 2’den küçük bulunmuştur (Çizelge 4.12).

Deney içi ve deneyler arası kesinlik sonuçları Çizelge 4.13 ve Çizelge 4.14'te verilmiştir. Deney içi ve deneyler arası kesinlik deneylerinin varyasyon katsayıları

%2'den küçüktür. Bu sonuçlar rufinamit için yöntemin tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir.

Kullanılan analiz yönteminin sadece analiz etmek istenilen maddeyi saptadığının ispatı için blank plazma, mobil faz ve etkin madde içeren standart çözeltileri UPLC-MS sistemine enjekte edilmiştir. Blank plazma ve mobil fazda rufinamit pikiyle girişim yapan bir pike rastlanmamış olup yöntemin özgün olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16).

Biyoanalitik yöntem validasyonunda rufinamit için analitik yöntemin LOD değeri 0,015 µg/mL, LLOQ değeri 0,040 µg/mL olarak bulunmuştur.

Rufinamitin plazma içerisindeki stabilitesi otomatik örnekleyici stabilitesi ve dondurma-çözdürme stabilitesi olmak üzere iki ayrı şekilde incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar rufinamitin otomatik örnekleyicide 96 saat stabil olduğunu ve 3 döngü dondurma-çözme döngüsünde stabil kaldığını göstermiştir (Çizelge 4.15 ve Çizelge 4.16).

5.3. Referans Ürün Karakterizasyonu

Referans ürün olan Inovelon® film tablet için kalitatif ve kantitatif içerik incelenmiş (Çizelge 4.17), fizikokimyasal karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.18). Referans ürünün üretim yönteminde etkin maddenin ıslanabilirliğini artırmak amacıyla etkin madde öncelikle SLS ile granüle edilmektedir. Bu ilave yaş granülasyon işleminin haricinde referans ürün tablet formülasyonlarında sıklıkla kullanılan yardımcı maddeleri içeren konvansiyonel film tablettir (EMA, 2007). Fizikokimyasal karakterizasyonu incelendiğinde elde edilen ortalama tablet ağırlığı sonucu literatür ile uyumludur (Portman, Hoffmeier, Burkhard, Sherrer ve Szelagiewicz, 2004b). İlaveten miktar tayini, ilgili bileşikler ve çözünme tayini sonuçları, USP Rufinamit tablet bitmiş ürün monografında belirtilen kriterleri karşılamaktadır (USP, 2020a).

5.4. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları Öncesinde Risk Analizleri

Tüm varyasyon kaynaklarının tespit edilmesi amacıyla öncelikle kalitatif bir risk analizi yöntemi olan “balık kılıcı diyagramı (Ishikawa) (Şekil 4.17) çizilmiş, ardından yarı kalitatif bir risk analizi yöntemi olan sebep-sonuç matriksi yöntemi kullanılarak QTPP ve CQA’ler tespit edilmiştir (Çizelge 4.19). Gerçekleştirilen bu risk değerlendirmesi sonucunda CQA’lerin “miktar tayini, ilgili bileşikler, çözünme, su içeriği ve kristal özellikler” olduğu tespit edilmiş ve formülasyon gelişimi çalışmalarında bu kalite özellikleri incelenmiştir.

Risk analizleri çalışmalarının devamında kantitatif bir risk analizi yöntemi olan LeanQbD® ile CQA’ler üzerinde etkili CMA (Şekil 4.18) ve CPP’ler (Şekil 4.19) belirlenmiştir. Elde edilen veriler literatürle uyumludur.

Bu doğrultuda tespit edilen CMA’lar risk skoruna göre en yüksekten düşük riskli olacak şekilde sırasıyla etkin maddenin kristal özelliği (Ligon, Liska, Stampfl, Gurr ve Mülhaupt, 2017), etkin maddenin erime derecesi (Vo, Park ve Lee, 2013), etkin maddenin sıcaklık stabilitesi (Alhnan ve diğerleri, 2016; Okwuosa ve diğerleri, 2016), polimerin erime derecesi (Vo ve diğerleri, 2013), filamentin mekanik özelliği (Aho, Boetker, Baldursdottir ve Rantanen, 2015; Elbadawi ve diğerleri, 2020), polimerin sıcaklık stabilitesi (Alhnan ve diğerleri, 2016; Okwuosa ve diğerleri, 2016), sürfaktan tipi ve seviyesi, polimer tipi ve seviyesi (Aho ve diğerleri, 2015; Elbadawi ve diğerleri, 2020) ile plastikleştirici tipi ve seviyesi (Buanz ve diğerleri, 2015) olarak tespit edilmiştir. Formülasyon geliştirme çalışmalarında yüksek riskli olarak belirlenen CMA’lar üzerinde yapılan değişikliklerin CQA üzerindeki etkileri incelenerek formülasyon optimize edilmiştir.

İlaveten tespit edilen CPP’ler risk skoruna göre en yüksekten düşük riskli olacak şekilde sırasıyla 3DP baskı ekstrüzyon sıcaklığı (Skowrya, Pietrzak ve Alhnan, 2015), filament ekstrüzyon sıcaklığı (Aho ve diğerleri, 2015; Elbadawi ve diğerleri, 2020), 3DP tablet iç dolgu oranı (Goyanes ve diğerleri, 2017a; Tyson, Hilton ve Andreae, 2015) ve 3DP tablet geometrik yapısı (Goyanes, Robles Martinez, Buanz, Basit ve Gaisford, 2015; Goyanes ve diğerleri, 2017b) olduğu tespit edilmiş ve formülasyon gelişimi çalışmalarında bu parametreler incelenerek kontrol altında tutulmuştur.

5.5. Plasebo filament formülasyonları üzerinde yapılan çalışmalar

Formülasyon gelişimi çalışmalarının başlangıcında, ekstrüzyon ve 3DP işlemlerine uygun yardımcı maddelerin seçimi amacıyla plasebo formülasyonları ile çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda çözünmeyi artıracabilecek farklı polimerler, plastikleştiriciler ve sürfaktanların etkisi incelenmiştir. Plasebo formülasyonların mekanik özellikleri incelenmiştir.

Filament kırılabilirliği (*brittleness*), literatürde genellikle homojen olmayan polimer iç yapısına bağlı olarak ifade edilen (Ligon ve diğerleri, 2017), 3DP yönteminin en kritik materyal özelliklerinden (CMA) biridir. Filament kırılabilirliği çok yüksek ise 3DP ekstrüzyon başlığında kırılmakta, başlık ucu tıkanmakta ve baskı işlemi gerçekleşmemektedir. Formülasyon gelişimi çalışmamızda filamentlerin mekanik dayanıklılığı, kopma kuvveti (*breaking force*) ve uzama yüzdesi (*elongation percentage*) gibi tensiometrik analizler üzerinden değerlendirilmiştir. Yüksek kopma kuvveti ve uzama yüzdesi, filamentin düşük kırılabilirlikte olduğunu ifade etmektedir.

Farklı polimerlerin etkisi

Soluplus[®], HME formülasyonlarında yüksek performans gösteren ve sıklıkla kullanılan yeni bir Polivinil kaprolaktam/Polivinil asetat/Polietilen glikol graft kopolimeridir (Repka ve diğerleri, 2018). Çözünme ve çözünürlüğü artırdığı için sıklıkla kullanılmaktadır (Hardung, Djuric ve Ali, 2010). Soluplus[®] ile filament ekstrüzyonu kolaydır, hammadde kolaylıkla homojen olarak erimiştir. Fakat tek başına kullanıldığında çok kırılabilir filamentler elde edilmiştir. Lim ve ark. (Lim ve Hoag, 2013) benzer şekilde, sadece Soluplus[®] içeren film formülasyonlarında aşırı kırılabilirlik olduğunu gözlemlemişlerdir.

Kollidon[®] VA64, HME formülasyonlarda dispersant ve çözündürücü ajan olarak kullanılmaktadır (BASF, 2012:10-100). Fu ve ark. (Fu ve diğerleri, 2016) katı dispersiyon formülasyon çalışmalarında Kollidon[®] VA64 ile çözünmenin artırıldığını göstermişlerdir. Bununla birlikte tek başına kullanıldığında kırılabilir yapısı nedeniyle filament elde edilememiştir. Benzer bulguyu daha önce Solanki ve ark. (Solanki, Tahsin, Shah ve Serajuddin, 2018) da gözlemlemiştir.

Polimer seçimi aşamasında değerlendirilen polimerler arasında en yüksek mekanik dayanıklılık, HPMC ile elde edilmiştir.

Elde edilen bu veriler doğrultusunda HPMC ile mekanik dayanıklılığın artırılması, bununla birlikte Soluplus® ve Kollidon® VA 64 ile çözünme ve çözünürlüğün artırılması hedeflenmiştir. Literatürde FDM-3DP yönteminde mekanik özellikleri iyileştirmek, aynı zamanda çözünmeyi artırmak amacıyla HPMC ve Kollidon®VA64 karışımlarının hazırlandığı görülmektedir (Solanki ve diğerleri, 2018). Bu doğrultuda Soluplus®: Kollidon® VA64: HPMC polimerleri “%43:%25:%25” oranında karıştırılarak FDM filamentlerde optimum mekanik dayanıklılık ve 3DP tabletlerde maksimum çözünme elde edilmiştir (Çizelge 4.20).

Farklı plastikleştiricilerin etkisi

Plastikleştirici maddelerin HME formülasyonlarda filamentlerin mekanik özelliklerini iyileştirici etkisi literatürde belirtilmektedir (Repka, Gerding, Repka ve McGinity, 1999). Plastikleştiriciler polimer zincirleri arasındaki serbest hacmi artırır, zincir mobilitesini artırır ve bu sayede film esnekliği artar (Lim ve Hoag, 2013). Plastikleştirici maddelerin molekül ağırlıkları ne kadar küçük olursa, elde edilen plastikleştirici etki de o kadar büyük olmaktadır (Buanz ve diğerleri, 2015). Triasetin, incelenen plastikleştiriciler arasında en düşük molekül ağırlığına (218 g/mol) sahip olan plastikleştiricidir. Bununla birlikte literatürde HME formülasyonlarında sıklıkla tercih edilmektedir (Arafat ve diğerleri, 2018). Bu bilgiler ışığında formülasyon çalışmamızda Triasetin kullanılmasına karar verilmiştir (Çizelge 4.20).

Farklı sürfaktanların etkisi

Polimer ve plastikleştirici seçiminin ardından, çözünürlük ve çözünmeyi artırması amacıyla farklı sürfaktanların filamentlerin mekanik dayanıklılıkları üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Bu doğrultuda incelenen sürfaktanlar arasından Transcutol ile çok yapışkan yapıda bir eriyik meydana gelmiş ve filament elde edilememiştir. Hidroksipropil beta-siklodekstrin ile 3D baskıya uygun, yeterli mekanik dayanıklılığa sahip filamentler elde edilememiştir.

Bununla birlikte Tween® 80 ve Gelucire® tipleri ile yeterli mekanik dayanıklılığa sahip filamentler elde edilebilmiştir. Tüm filamentlerde yüksek kopma kuvveti ve uzama yüzdesi

elde edilmiştir (Çizelge 4.20). Sürfaktan tipi ve miktarının optimizasyonu, bir sonraki aşamada, rufinamit yüklü formülasyon çalışmaları ile gerçekleştirilmiştir.

5.6. Rufinamit yüklü 3DP tablet formülasyonlarının geliştirilmesi üzerine çalışmalar

Filament elde edilebilen uygun yardımcı maddelerle rufinamit içeren formülasyonlar çalışılmıştır. Bu amaçla hazırlanan farklı sürfaktan tiplerinin, sürfaktan oranlarının ve dispersantın etkisi incelenmiştir. İlaveten konvansiyonel tabletin de çözünme üzerinde etkisi incelenmek istenmiştir. Hazırlanan formülasyonlara ait fizikokimyasal ve mekanik özellikler Çizelge 4.22’de sunulmuştur. Elde edilen bulgulara göre rufinamit içeren formülasyonlarda tüm sürfaktanlarla (Tween® 80 ve Gelucire tipleri) 3DP baskı için yeterli mekanik dayanıklılıkta filament elde edilebilmektedir.

Gelucire® 48/16, polimer karışımında polimer zincirleri arasında serbest boşlukları artırarak plastikleştirici etki göstermektedir. Bunun sonucu olarak %4 derişimine kadar artan derişimlerde kullanıldığında, mekanik dayanıklılığın arttığı gözlenmiştir. Bununla birlikte Gelucire® 48/16 için yüksek derişimler denendiğinde, filamentlerin mekanik dayanıklılıkları düşmektedir. Maksimum % 4 kullanımı ile 3DP baskı yapılabilecek filamentler elde edilebilmiştir (Çizelge 4.21).

Tüm formülasyonlarda ortalama tablet ağırlığı $1333 \text{ mg} \pm \%5$ ve sertliği $8 \text{ kp} \pm 1 \text{ kp}$ olarak elde edilmiştir. Miktar tayini $\%90\text{-}\%110$ aralığında bulunmuştur. Formülasyonların tamamında su miktarı $\%1.6\text{-}\%1.8$ aralığındadır. Dolayısıyla sürfaktan tipi, sürfaktan miktarı, iç dolgu oranı ya da tablet geometrisinin 3DP tabletlerin fizikokimyasal özellikleri üzerinde etkisi olmadığı, tüm fizikokimyasal özelliklerin dar bir aralıkta homojen olarak elde edildiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.21, Çizelge 4.22).

5.7. Rufinamit içeren filament ekstrüzyonu sonrası ekstrüder temizlik yönteminin geliştirilmesi

Vidalı ekstrüderlerin temizlik işlemleri, hem farklı etkin maddelerle çalışılması, hem de farklı formülasyonlar arası geçişlerde büyük sorun oluşturmaktadır. Ekstrüder vidasının çok fazla girintili çıkıntılı yapıda olması, ayrıca kullanılan bazı polimer karışımlarının yapışkan yapıya sahip olabilmeleri nedeniyle temiz bir üretim gerçekleştirmekte zorluklar yaşanabilmektedir.

Bu amaçla farklı ekstrüder temizleyici maddelerin etkisi incelenmiştir. Elde edilen veriler, özel olarak ilaç endüstrisi için geliştirilmiş ve ilaç üretiminde kullanılan polimerlerin bir karışımı halinde piyasada bulunan “HME Cleaner Plus® GMP (Biogrand)” ürünü ile başarılı bir temizliğin yapılabileceğini göstermiştir (Şekil 4.20).

5.8. Optimum Filament ve 3DP Tablet Formülasyonu Üzerinde Yapılan Kontroller

5.8.1. Geçimlilik testleri

Erime derecesi tayini

Gerçekleştirilen çalışmada rufinamitin fiziksel karışım, filament ve 3D tablette erime derecesi, saf etkin madde ve referans ürüne benzer şekilde 230°C-240°C arasında bulunmuştur. Elde edilen bu veri literatürle uyumludur (Singh ve diğerleri, 2013). Plastikleştirici maddelerin polimer karışımlarında erime derecesini düşürdükleri, hatta proses sıcaklığını düşürmek amacıyla eriyik ekstrüzyonu şeklinde geliştirilen formülasyonlarda kullanıldığı bilinmektedir. Bu doğrultuda plastikleştirici amacıyla kullanılan triasetin ile rufinamitin 1:1 karışımında ve plastikleştirici özellik gösteren Gelucire® 48/16 ile rufinamitin 1:1 karışımında beklenildiği gibi erime derecesinde düşme gözlenmiştir. 3DP tablet için de erime derecesinde meydana gelen yaklaşık 5°C’lik kayma gözlenmiş, bunun sebebinin formülasyon içerisinde kullanılan Gelucire® 48/16 ve Triasetin gibi plastikleştirici maddeler olduğu düşünülmüştür. Bununla birlikte hiç bir karışım da ya da 3DP tablette rufinamit piki yok olmamıştır veya degradasyon piki oluşumu gözlenmemiştir. Elde edilen bu veriler yardımcı maddeler ve rufinamit arasında kimyasal bir geçimsizlik olmadığını, ilaveten FDM ve 3DP proseslerinin de rufinamitin fizikokimyasal yapısında herhangi bir değişikliğe neden olmadığını göstermiştir (Şekil 4.21).

Kristal modifikasyonunun incelenmesi

Rufinamit polimorfizm gösterir. A, A’, B ve C kristal modifikasyonları Amerikan patent ofisinden yayımlanmış US8076362 B2 (Portman, Hoffmeier, Burkhard, Scherrer ve Szelagiewicz, 2011), US 6740669 B1 (Portman, Hoffmeier, Burkhard, Sherrer ve Szelagiewicz, 2004) ve US 7750028 B2 (Portman, Hofmeier, Burkhard, Scherrer ve szelagiewicz, 2010) patentlerinde tarif edilmiştir. Özellikle A ve A’ kristal modifikasyonları,

yüksek stabiliteye sahip ve farmasötik etkin madde olmasını sağlamaktadır (Portman ve diğerleri, 2011; Portman ve diğerleri, 2004; Portman ve diğerleri, 2010). Rufinamitin kristal yapısı, XRD difraktogramı üzerinden incelendiğinde, 3DP tabletin saf etkin madde ve referans ürün olan Inovelon® ile aynı spesifik piklere sahip olduğu gözlenmiştir. Özellikle referans ürün patentinde belirtilen “çok güçlü” ve “güçlü” düzlemler arası boşluk değerleri (d) olan 4.84°, 4.55° ve 3.25° pikleri net bir şekilde gözlenebilmiştir. Elde edilen bu bulgu 3DP tablet üretim yönteminin ve formülasyonda kullanılan yardımcı maddelerin, rufinamitin polimorfik yapısı üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığını, rufinamitin polimorfik yapısının, etkinlikten sorumlu polimorf olan A-polimorfu (*Modification A*) olduğunu göstermiştir (Portman ve diğerleri, 2004a).

FTIR spektrumu

Elde edilen FTIR spektrumları Şekil 4.24-Şekil 4.27’de, spesifik dalga sayıları ile ilgili veriler Çizelge 4.25’te sunulmuştur. Rufinamit etkin maddesine spesifik tüm dalga sayıları optimum formülde gözlenmiştir.

5.8.2. In-vitro çözünme tayini

Formülasyon geliştirme çalışmasının asıl amacı, rufinamitin 3DP tabletten çözünmesinin artırılmasıdır. Bu amaçla taşıyıcı polimer karışımı olarak HPMC, Soluplus® ve Kollidon®VA64 amorf polimerleri kullanılmıştır. Çözünmeyi artırmak amacıyla formülasyona ilaveten sürfaktan maddeler eklenmiş ve sürfaktan tipi (Şekil 4.28) ve sürfaktan oranının (Şekil 4.29) çözünme üzerindeki etkisi incelenmiştir. Ardından formülasyonda dispersant olarak kullanılan Kollidon®VA64’ün etkisi gösterilmiştir (Şekil 4.30). İlaveten optimum formülasyon için iç dolgu oranı (Şekil 4.31) ve tablet geometrisinin (Şekil 4.32) çözünme üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Optimum formülasyon ve 3DP üretim yönteminin tespitinin ardından, 3DP tablet ve konvansiyonel tabletin çözünme profilleri (Şekil 4.33) ile referans ürün ile farklı pH’larda (Şekil 4.34) ve farklı dozlarda çözünme profilleri (Şekil 4.35 ve Şekil 4.36) karşılaştırılmış ve in-vitro doğrusallıkları incelenmiştir.

Sürfaktan tipi ve oranının etkisi

Elde edilen bulgulara göre Tween®80'in çözünmeyi miseller çözünürlük ile artırdığı (Mura ve diğerleri, 2005) fakat Gelucire® tipleri kadar fazla artırmadığı gözlenmiştir.

Bununla birlikte en yüksek çözünme Gelucire® 48/16 ile elde edilmiştir (Şekil 4.24). Gelucire® tipleri, iyi karakterize edilmiş PEG-esterleri, küçük gliserit fraksiyonu ve serbest PEG yapılarından meydana gelmiş, non-iyonik suda dağılabilen çözünürlük artırıcı sürfaktanlardır. Su ile temas ettiklerinde kendiliklerinden emülsifiye olurlar. Çözünürlük artırma güçleri HLB (hidrofilik lipofilik balans) değerlerine bağlıdır. En yüksek HLB değerine sahip olan türevleri, en yüksek çözünürlük artırıcı etkiye sahiptir (Gattefosse, 2015b) ve çözündürücü ajan olarak kullanılır (Jain ve diğerleri, 2004). Gliserit fraksiyonu içeren Gelucire® türevleri, suda çözünmeyen türevlerdir. Bu doğrultuda Gelucire®44/14 suda çözünmeyen bir türevken Gelucire®48/16 suda çözünebilen türevdir (Gattefosse, 2015b). İlâveten Gelucire®48/16'nın HLB değeri 16 olup Gelucire® 44/14'ten büyüktür (HLB:14).

Rufinamitin yüksek dozlarda çözünürlüğünün düşük olması nedeniyle absorpsiyonunun yüksek olmadığı ve bu nedenle non-lineer farmakokinetik gösterdiği bilinmektedir (Gall, Vancea, Szilagyi, Gall ve Kolcsar, 2015). Dolayısıyla artan bu çözünme, özellikle yüksek terapötik dozlarda in-vivo biyoyararlanımın artırılmasında kritik rol oynayabilecektir. Özellikle rufinamit gibi hidrofobik ilaçların biyoyararlanımını artırmak için Gelucire® 48/16 önerilmektedir (Gattefosse, 2015b). Literatürde Gelucire® türevleri ile 3DP formülasyonlarda düşük çözünürlüklü etkin maddeler üzerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır (Vithani ve diğerleri, 2019). Jannin ve ark. (Jannin ve diğerleri, 2015), düşük çözünürlüklü üç farklı BCS Sınıf II etkin madde için Gelucire® 44/14 ve Gelucire® 48/16'nın çözünme üzerindeki etkilerini incelemiş ve en yüksek çözünme artışının Gelucire® 48/16 ile elde edildiğini tespit etmişlerdir. Formülasyon çalışmamızda bizim de elde ettiğimiz sonuçlar literatürle uyumludur. En yüksek çözünme Gelucire®48/16 kullanılan formülasyon ile elde edilmiştir. Çalışmamızın devamında Gelucire® 48/16'nın farklı oranlarının çözünme üzerindeki etkisi incelendiğinde, beklenildiği gibi Gelucire® oranı artışının çözünmeyi artırdığı gözlenmiştir. En yüksek çözünme %4 oranında Gelucire® 48/16 içeren formülasyon ile elde edilmiş ve optimum oran olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu bulgu, Gelucire®48/16'nın rufinamitin ıslanabilirliğini artırması ve çözündürücü etkisi ile açıklanabileceği düşünülmektedir.

Geliştirilmiş olan formülasyon, kullanılan polimerlerin amorf olması ve sürfaktan içermesi nedeniyle “üçüncü jenerasyon katı dispersiyonlar” sınıfına girmektedir. Amorf polimerler sudaki yüksek çözünürlükleri nedeniyle etkin maddelerin ıslanabilirliklerini artırabilmektedir. Amfifilik yapıdaki sürfaktanlar ise etkin maddenin taşıyıcı polimer içinde daha iyi karışmasını sağlamakta, çözünme ortamının yüzey gerilimini düşürerek etkin maddenin ıslanabilirliğini artırmakta ve bu sayede etkin maddenin çözünürlük ve çözünmesini artırmaktadır (Vo ve diğerleri, 2013).

Rufinamitin erime derecesi proses sıcaklığının üzerinde olduğu için rufinamit amorf taşıyıcılar içinde erimemekte ya da çözünmemektedir, bu nedenle elde edilen katı dispersiyon, üçüncü jenerasyon katı dispersiyonların bir alt grubu olan “amorf katı süspansiyon” sınıfına girmektedir. Amorf katı süspansiyonlar, etkin maddenin rekristalizasyona uğramayacak olması nedeniyle hem stabilite esnasında dayanıklı, hem de biyoyararlanımın belirgin derecede artırılabilirdiği katı dispersiyon türleridir (Ali, Williams ve Rawlinson, 2010; Yan ve diğerleri, 2012).

Dispersant olarak kullanılan Kollidon® VA64’ün etkisi

Formülasyonda polimer karışımında dispersant olarak kullanılan ve amorf bir polimer olan Kollidon® VA 64’ün çözünme üzerindeki etkisi incelenmiştir (Şekil 4.30). Amorf polimerler sudaki yüksek çözünürlükleri nedeniyle etkin maddelerin ıslanabilirliklerini artırabilmektedir (Vo ve diğerleri, 2013). Elde edilen veriye dayanarak Kollidon® VA64’ün kullanımının çözünmeyi artırıcı etkisi olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu bulgu literatür ile uyumludur (Fu ve diğerleri, 2016).

İç dolgu oranı ve 3DP tablet geometrisinin etkisi

Optimum sürfaktan tipi ve miktarının belirlenmesinin ardından, formülasyonun 3D baskı esnasında tasarlanan iç dolgu oranının çözünme üzerindeki etkisi incelenmiş ve Şekil 4.31’de sunulmuştur. Çözünme verilerine göre beklenildiği gibi düşük iç dolgu oranına sahip 3DP tabletlerde çözünme en hızlı şekilde gerçekleşmiştir. Elde edilen bu gözlem, düşük iç dolgu oranındaki yüksek yüzey alan ile ilişkilendirilmiştir. İç dolgu oranındaki artış, tablet porlarının daha sıkı olmasına, yüzey alanın azalmasına, dolayısıyla çözünmenin azalmasına neden olmaktadır. Fakat düşük iç dolgu oranı ile üretilen tabletlerin görünümü uygun değildir

ve dayanıksızdır. Bu nedenle 3DP tabletlerde hem yüksek çözünme elde edilebilecek hem de mekanik özellikleri uygun olan optimum iç dolgu oranının %50 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.31). İç dolgu tasarımı sonucu elde edilen porozitenin çözünme üzerindeki etkisi literatürde incelenmiştir. Sadia ve ark. (Sadia ve diğerleri, 2018) çoklu kanallı tablet tasarımları ile çözünmeyi artırmış, Arafat ve ark. (Arafat ve diğerleri, 2018) daha geniş iş boşluklarla daha hızlı salım elde edildiğini göstermişlerdir. Benzer şekilde Isreb ve ark. da daha iç dolgu yapılarında daha hızlı salım elde etmişlerdir (Isreb ve diğerleri, 2019).

Tez çalışmasında gerçekleştirilen çalışmada da literatüre benzer şekilde daha düşük iç dolgu oranı ile elde edilen geniş por yapısı sayesinde çözünme esnasında 3DP tablet içine girecek ortam sıvıları için bir direnç oluşmamakta ve bu da 3DP tabletin daha fazla çözücü ile temas etmesini ve daha hızlı salmasını sağlamaktadır (Sadia ve diğerleri, 2018). İlaveten iç dolgu tasarımıyla meydana gelen por çapları yeterince büyük olduğu için literatüre benzer şekilde polimerlerde difüzyon bariyeri oluşturabilecek şişme veya jel oluşumu gözlenmemektedir (Arafat ve diğerleri, 2018).

İlaveten tablet geometrisinin çözünme üzerindeki etkisi de incelenmiş olup elde edilen verilere göre en yüksek çözünme oblong tablet ile elde edildiği için optimum 3DP geometrisinin “oblong” olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu bulgu literatürde de daha önce tespit edilen bir bulgudur (Gültekin, Tort ve Acartürk, 2019) (Şekil 4.32). Goyanes ve ark. (Goyanes, Robles Martinez, Buanz, Basit ve Gaisford, 2015c) benzer bir çalışmalarında tablet şekline göre salım davranışlarını incelemiş ve tabletlerden ilaç salımının yüzey alanına değil, bunun yerine “Hacim/Yüzey alan” oranına bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Tez çalışmasında bu oran oblong tabletlerde en yüksek olduğu için en yüksek salım gözlenmiştir.

Üretim yönteminin etkisi

FDM-3DP üretim yönteminin çözünme üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla optimum formülasyon içeriği ile fiziksel karışım ile tablet halinde hazırlanan konvansiyonel tablet, filament öğütülüp tablet haline getirilen tablet ve 3DP tablet üzerinden çözünme profilleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen verilere göre filament ekstrüzyonu esnasında erime sonucu meydana gelen katı dispersiyonun çözünmeyi artırdığı, ilaveten 3DP tasarım ile çözünmenin daha da yükseldiği tespit edilmiştir (Şekil 4.33).

Elde edilen bu bulgular, Gelucire® 48/16 ve Soluplus®'ın ıslanabilirlik ve çözünmeyi artırması için rufinamit ile katı dispersiyonunun hazırlanması gerektiğini düşündürmüştür. Fiziksel karışımda etkin madde ile yeterli etkileşim meydana gelmemekte, dolayısıyla çözünme artmamaktadır. Benzer bir bulguyu Vasoya ve ark. da (Vasoya ve diğerleri, 2018) yayımlamıştır. Düşük çözünürlüklü bir etkin maddenin benzer yardımcı maddelerle hazırladıkları fiziksel karışımı ve katı dispersiyonunun çözünme özelliklerini karşılaştırmış ve katı dispersiyon ile daha yüksek çözünme elde edildiğini ifade etmişlerdir.

Filamentin öğütülmesi suretiyle hazırlanan tabletler ile 3DP tablet karşılaştırıldığında, en yüksek çözünme 3DP tablette gözlenmiştir. Bunun bir sebebinin 3DP baskı esnasında ikinci kez sıcaklıkla katı dispersiyonunun oluşması ve polimer ve sürfaktanlarla daha iyi bir etkileşimin meydana gelmiş olmasıdır. İkinci sebebinin ise, 3DP tablet iç dolgusunun sağladığı porozitenin, konvansiyonel tablete göre oldukça üstün olması ve yüzey alanın çok daha yüksek olması nedeniyle olduğu düşünülmüştür. 3DP tablet porozitesinin çözünme üzerindeki etkisi daha önce Sadia ve ark. tarafından da yayımlanmış, yüksek yüzey alana sahip iç tasarımla üretilmiş tabletlerde daha yüksek çözünme elde edilmiştir (Sadia, Arafat, Ahmed, Forbes ve Alhnan, 2018). Literatürde benzer şekilde geniş iç boşluklu 3DP tabletlerde daha hızlı çözünme elde edilmiştir (Arafat ve diğerleri, 2018; Isreb ve diğerleri, 2019). Gerçekleştirilen çalışmamızda 3DP tablet tasarımındaki geniş por boyutları, çözünme esnasında tablet içindeki sıvı akış direncini düşürmekte (Sadia ve diğerleri, 2018), ilaveten difüzyon bariyeri oluşturabilecek bir jel oluşumu meydana getirmemektedir (Arafat ve diğerleri, 2018).

Bu bilgiler ışığında 3DP tablet iç dolgu oranı ile tasarlanabilen por genişliği sayesinde çözünmenin artırılacağı ya da istenilen seviyede çözünmenin porozite tasarımı ile elde edilebileceği düşünülmektedir.

Farklı fizyolojik pH'larda çözünmeleri

Etkin maddenin non-iyonik yapıda olması nedeniyle SLS içermeyen ortamlarda pH'tan bağımsız olarak hem optimum 3DP tablet, hem de referans ürün çözünmemiştir. Elde edilen bu bulgu denge çözünürlük ve intrinsik çözünme çalışmaları ile tutarlıdır. Bununla birlikte %2 SLS bulunan ortamlarda, pH'tan bağımsız olarak sink koşul sağlanmakta ve rufinamid çözünmektedir (Şekil 4.34).

Optimum formülasyon ve referans ürünün farklı dozlarında çözünmeleri

Elde edilen verilere göre 200 mg dozda referans ürün pH'tan bağımsız olarak daha yüksek çözünme gösterirken terapötik doz olan 1600 mg dozda geliştirilen optimum formülasyonun çok daha yüksek çözündüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.35). Hem referans hem optimum formülasyonun SLS içermeyen ortamlarda çözünmemesi, etkin maddenin non-iyonik yapıda olması ve sadece yüzey aktif maddeler varlığında ıslanabildiğini göstermiştir.

Optimum formülasyon, amorf polimerler ve sürfaktanlar içeren ve katı dispersiyon tekniği ile üretilen bir formülasyondur. İlaveten 3DP baskı tekniği ile porozitesi çözünmesi artırılmaktadır. Bununla birlikte referans ürün yaş granülasyon tekniği ile hazırlanıp konvansiyonel tablet baskı ile üretilmiştir (Portman ve diğerleri, 2004a). Terapötik dozda (1600 mg) artan çözünmenin, optimum formülasyonda kullanılan amorf polimerler ve sürfaktanlar ile birlikte gerçekleştirilen katı dispersiyon ve 3DP tasarım sayesinde olduğu düşünülmektedir.

İlaveten 3DP üretimde hem filament ekstrüzyonu, hem de 3D baskı esnasında formülasyon iki kere sıcaklık ve basınca maruz kalmakta ve katı dispersiyonda çözünmeyi artıran fiziksel etkileşmeler daha yoğun bir şekilde meydana gelmektedir. Artan bu etkileşmenin 3DP tabletlerden elde edilen çözünmenin, filamentlerden daha yüksek seviyede olmasına sebep olduğunu düşündürmektedir.

In-vitro doğrusallık

Literatürde belirtildiği gibi rufinamit in-vivo koşulda non-lineer kinetik göstermektedir (eMC, 2020). Bu nedenle son olarak farklı dozlarda (100 mg- 1600 mg) gerçekleştirilen çözünme çalışmalarından elde edilen verilerle in-vitro salım için doğrusallık incelenmiştir (Şekil 4.36).

Elde edilen verilere göre referans üründe doz arttıkça çözünen madde miktarı doğrusal artmamakta iken (r^2 : 0,2757), geliştirilen optimum formülasyonda salım doğrusal olarak artmaktadır (r^2 :0,9804). Elde edilen bu sonucun, optimum formülasyonun çözünürlük ve çözünmesindeki artışa bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu bulgular doğrultusunda artırılan çözünme ile in-vivo farmakokinetiğin de doğrusal hale gelebileceği düşünülmektedir.

5.8.3. İntrinsik çözünme tayini

Denge çözünürlük çalışmasında rufinamit çözünürlüğünün pH'tan bağımsız olduğu ve SLS oranına bağımlı olduğu tespit edildiği için IDR çalışmasında sadece farklı SLS oranlarındaki IDR değeri incelenmiştir.

Bu amaçla saf su ve % 2 SLS içeren ortamlarda yapılan IDR çalışmasında, %2 SLS içeren ortamdaki IDR artışı, denge çözünürlük çalışmasına benzer şekilde, üç kat fazla olduğu gözlenmiştir (sırasıyla 0,0049 mg/dk/cm² ve 0,0153 mg/dk/cm²) (Şekil 4.37 ve Çizelge 4.26). Rufinamitin çözünürlüğü, çözünme ortamındaki sürfaktan miktarından çok fazla etkilenmektedir. Elde edilen bu veriler literatüre göre etkin maddenin saf su ortamında düşük çözünürlüğe sahip olduğunu (< 0,1 mg/dk/cm²), bununla birlikte %2 SLS içeren çözeltide yüksek çözündüğünü (> 0,1 mg/dk/cm²) göstermektedir (Yu ve diğerleri, 2004).

İlaveten geliştirilen optimum formülasyondan rufinamitin intrinsik çözünme hızı, saf etkin maddenin yaklaşık 10 katı üzerindedir.

5.8.4. Salım kinetiği

Salım modelinin uygunluğunun belirlenmesinde r^2 ve MSC değerinin büyük, AIC değerinin küçük olması önemlidir. Tüm formülasyonların zamana karşı elde edilen kümülatif salım profilleri incelendiğinde r^2 , AIC ve MSC değerleri açısından tamamının Weibull kinetiği ile salım yaptığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.27). Formülasyonların β değeri incelendiğinde, <0,35 olan Inovelon® film tablet formülasyonunun “çok yüksek derecede düzensiz iç yapıya sahip sistemlerde gözlenebilecek” bir salım mekanizması ile saldığı, bununla birlikte β değeri “0,35-0,39” arasında olan optimum 3DP tablet formülasyonunun “düzenli fraksiyonel yüzeyden difüzyon” ile salım yaptığı gözlenmektedir (Papadopoulou, Kosmidis, Vlachou ve Macheras, 2006). Elde edilen bu veri, katmanlar halinde üretilen 3DP formülasyonun salımının da referans ürüne göre daha düzenli bir şekilde gerçekleştirdiğini göstermektedir.

5.8.5. In-vitro stabilite çalışmaları

Hazırlanan optimum tabletlerin fizikokimyasal stabilitesi (tablet boyutu, ağırlığı, sertliği, miktar tayini, su miktarı, çözünme) ICH Q1A (R2) kılavuzuna uygun olacak şekilde 25±2°C/%60±5 bağıl nem koşulunda 20 ay, 40±2°C/%75±5 bağıl nem koşulunda 6 ay

süreyle bekletilerek incelenmiştir. Elde edilen stabilite sonuçları Çizelge 4.26 ve Şekil 4.32’de sunulmuştur. Veriler incelendiğinde geliştirilen optimum formülasyonun $25\pm 2^{\circ}\text{C}/\%60\pm 5$ bağıl nem koşulunda 20 ay, $40\pm 2^{\circ}\text{C}/\%75\pm 5$ bağıl nem koşulunda 6 ay süresince stabil olduğu gözlenmiştir. HME yöntemi ile üretilen formülasyonlarda stabilite süresince rekristalizasyon ve çözünmede düşme sıklıkla görülen bir problemdir. Elde edilen veriler geliştirilmiş olan formülasyonda stabilite süresince etkin maddenin kristal yapısının değişmediğini, bu sayede stabilite süresince benzer çözünme profili elde edildiğini göstermiştir.

5.8.6. Formülasyonların morfolojik özelliklerinin belirlenmesi

Referans ürün (Inovelon® film tablet), optimum formülasyona ait filament, optimum formülasyona ait plasebo filament ve optimum formülasyona ait 3DP tablet (İç dolgu oranları %10, %50 ve %100) için elde edilen SEM görüntüleri Resim 4.1-Resim 4.6’da sunulmuştur. Elde edilen görüntüler incelendiğinde plasebo filamentlerinin yüzeyinin, rufinamit yüklü filamentlere göre daha pürüzsüz olduğu gözlenmiştir. Bu bulgunun, etkin madde erime derecesinin (230°C - 240°C) proses sıcaklığının (120°C) üzerinde olması nedeniyle erimemiş partiküler yapılardan kaynaklandığı düşünülmektedir. İlaveten Inovelon® film tabletin içeriği oldukça düzensiz iken 3DP tabletlerde katman katman üretim sonucu meydana gelen düzenli tabakalı görünüm, SEM görüntüsü ile de tespit edilmiştir.

5.8.7. Hücre kültürü çalışmaları

Caco-2 ve Hep G2 hücrelerinde rufinamitin sitotoksik etkilerinin MTT testi ile değerlendirilmesi

Rufinamit saf etkin madde, referans ürünü olan Inovelon® film tablet ve optimum 3DP tablet formülasyonlarının sitotoksikite testlerinde Caco-2 insan kolorektal kanser hücre hattı ve Hep G2 insan hepatoselüler karsinoma hücre hatları kullanılmıştır. Karaciğer hücre hattının seçiminde, etkin maddenin en ciddi yan etkisinin karaciğer toksisitesi olduğu dikkate alınmıştır (Bialer ve diğerleri, 2013). Hep G2 hücre hattı, normal karaciğer parankimal hücrelerine benzer sentez ve plazma proteini sekresyonu yapabilmesi nedenleriyle ksenobiotiklerin incelendiği çalışmalarda sıklıkla tercih edilen bir hücre hattıdır (Nowrouzi ve diğerleri, 2010). Caco-2 hücre hattı, oral kullanım için tasarlanan ilaç şekillerinin sitotoksikitesinin değerlendirilmesinde L929 hücre hattı ile beraber en çok kullanılan hücre

hattıdır (Bu, Narayanan, Dalrymple, Cheng ve Serajuddin, 2016; Elsayed, Sharaf-Eldin ve Wadaan, 2015; Fernandes ve diğerleri, 2012). Caco-2 hücre hattının seçilmesinin bir diğer nedeni ise permeabilite çalışmasının yapılacağı Caco-2 hücrelerinin hücre geçiş çalışması esnasında hangi derişimlerde canlı kalabileceğinin görülmesidir.

Yapılan literatür taramasında etkin madde olan rufinamit için Hep G2 ya da Caco-2 hücre tipi üzerinde yapılan MTT testi sonucuna rastlanmamıştır. Bununla birlikte 5, 10 ve 20 µg/mL derişimlerde MDCK (Madin-Darby Köpek Böbrek hücreleri) üzerinde yapılan çalışmada etkin maddenin sitotoksik olmadığı ifade edilmektedir (Chan, Zhang, Zuo, Kwan ve Baum, 2014).

Hep G2 ve Caco-2 hücrelerine uygulanan tüm test gruplarında artan derişimlere (0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM) karşı % hücre canlılığı azalmıştır. Caco-2 (Şekil 4.38) ve Hep G2 (Şekil 4.39) hücrelerine uygulanan test gruplarında en yüksek hücre canlılığının 3DP formülasyonla elde edildiği tespit edilmiştir (>%80) (p <0,05). Bu durum geliştirilmiş olan formülasyonun sitotoksik olmadığını göstermiştir. En düşük hücre canlılığı ise referans ürün olan Inovelon® film tablet ile elde edilmektedir (p <0,05). Bununla birlikte Caco-2 geçiş çalışmalarında kullanılacak etkin madde ve formülasyonların (Inovelon® ve A5-3DP) Caco-2 hücre hattında gerçekleştirilen MTT testine tabi tutulduktan sonra elde edilen yüksek % canlılık değerleri, etkin madde ve formülasyonların permeabilite çalışmasında hücre canlılığını düşürmeksizin (>%50) güvenle kullanabileceğini göstermiştir.

Geliştirilmiş 3DP tablet formülün saf etkin maddeden daha az sitotoksik olma sebebinin çözünürlükle ilgisi olabileceği düşünülmüştür. Formülasyonun çözünürlüğü saf etkin maddeden oldukça yüksektir. Saf etkin madde ile MTT çalışması esnasında zaman için de az da olsa etkin maddede meydana gelebilecek çökme sitotoksik etki göstermiş olabilirken A5-3DP tamamen çözündüğü ve çökmediği için bu sitotoksik etki gözlenmemiştir.

Referans ürün ile en düşük hücre canlılığı elde edilme nedenleri incelendiğinde, etkili olabilecek farklılığın, optimum 3DP formülasyonunda kullanılmayan ve sadece referans ürün formülasyonunda kullanılan yardımcı maddeler olabileceği düşünülmüştür. Referans ürün (Inovelon®) (Portman ve diğerleri, 2004a) ve optimum 3DP tablet (A5-3DP) içerik karşılaştırması Çizelge 4.31’de sunulmuş olup özellikle koloidal silika, sodyum lauril sülfat,

talk ve titanyum dioksitin, referans üründe gözlenen yüksek sitotoksiteden sorumlu olabileceği düşünülmektedir.

İlaveten çalışma esnasında referans ürünün film kaplamanın çok zor çözündüğü gözlenmiş olup çalışma esnasında zaman içinde meydana gelebilecek çökme nedeniyle de hücre canlılığı üzerinde negatif etkili olabileceği düşünülmektedir. Saf etkin maddede de zaman içinde çökme olabileceği göz önüne alındığında, film kaplamadan kaynaklanabilecek ilave çökmenin sitotoksik etkisi olabileceği düşünülmektedir.

Formülasyonların permeabilite deneyleri

Gerçekleştirilen permeabilite deneyinde en yüksek permeabilite değerlerine optimum 3DP tablet ile ulaşılırken en düşük permeabilite değerleri saf etkin madde ile elde edilmiştir.

Deneyisel çalışma esnasında numunede meydana gelebilecek çökmeler, hücre yüzeyinin kaplanmasına ve ölmesine sebep olabilmekte ve bu durumda hücre geçişi gerçekleşmemektedir. Yapılan çalışmada saf etkin madde için hazırlanan test hazırlık vialinde, düşük çözünürlüğü nedeniyle çökme gözlenmiştir. Saf etkin madde ile elde edilen nispeten düşük permeabilitenin nedeninin bu çökme olabileceği düşünülmektedir.

Bununla birlikte optimum 3DP tabletten elde edilen permeabilite değerleri, üç çalışma derişimi için de referans üründen yüksek bulunmuştur.

Formülasyonda bulunan sürfaktan ya da emilim artırıcı maddelerin katı dispersiyon formülasyonlarında gastrointestinal emilimi artırdığı, özellikle lipit bazlı yardımcı maddelerin hücre membranı ile etkileşim kurarak ve GI sistemde efflux transporterleri inhibe ederek absorpsiyonu artırdığı literatürde paylaşılmıştır (Zhang, Xing, Zhao ve Ma, 2018). Referans ürün (Inovelon®) (Portman ve diğerleri, 2004a) ve optimum 3DP tablet (A5-3DP) içerik karşılaştırması Çizelge 4.31’de sunulmuş olup özellikle çözünürlük ve emilim artırıcı olarak bilinen Soluplus® ve sürfaktan yapısında lipit bazlı bir yardımcı madde olan Gelucire® 48/16’nın, Optimum 3DP tablette gözlenen yüksek permeabiliteden sorumlu olabileceği düşünülmektedir.

Bununla birlikte benzer yardımcı maddeler kullanılsa bile, bitmiş ürün üretim prosesi ya da API sentez yolağı kaynaklı emilimde farklılıklar görülebileceği bilinmektedir (Akdag,

Gulsun, Izat, Oner ve Sahin, 2020). Referans ürün yaş granülasyon (EMA, 2007), optimum 3DP tablet HME tekniği ile katı dispersiyon şeklinde üretilmektedir. API kaynakları da farklıdır. HME tekniği, biyoyararlanım artırılması amacıyla kullanılan bir katı dispersiyon tekniğidir. Dolayısıyla optimum 3DP formülünde elde edilen yüksek emilimim (i) Formülasyonda kullanılan Soluplus® ve Gelucire® 48/16, (ii) HME ile katı dispersiyon üretim tekniği olduğu düşünülmektedir.

5.8.8. Ticari ürün Inovelon® film tablet ve optimum 3DP tablet formülasyonları ile yapılan in-vivo çalışmalar

Gerçekleştirilmiş olan çalışmada farmakokinetik parametreler literatürde verilen aralıkta elde edilmiştir (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1. Elde edilen farmakokinetik parametrelerin literatür ile karşılaştırması

	Doz: 20 mg/kg		Doz: 40 mg/kg		Literatürde Verilen Aralıklar
	Optimum 3DP Tablet (A05)	Inovelon®	Optimum 3DP Tablet (A05)	Inovelon®	
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	$2,98 \pm 0,52$	$2,50 \pm 0,17$	$5,43 \pm 0,37$	$3,50 \pm 0,39$	1,81 $\mu\text{g/mL}$ (200 mg, Oral) 2,0-4,0 $\mu\text{g/mL}$ (400 mg, Oral) (Xu ve diğerleri, 2016)
t_{max} (saat)	$3,00 \pm 0,51$	$2,17 \pm 0,33$	$4,67 \pm 0,83$	$3,83 \pm 0,94$	3-8 sa (Kothare ve diğerleri, 2017) (Coppola ve diğerleri, 2014)
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{saat/mL}$)	$44,89 \pm 5,93$	$46,50 \pm 4,73$	$84,35 \pm 6,78$	$80,72 \pm 3,67$	34,57 $\mu\text{g}\cdot\text{saat/mL}$ (200 mg, Oral) 49-57 $\mu\text{g}\cdot\text{saat/mL}$ (400 mg, Oral) (Xu ve diğerleri, 2016)
$t_{1/2}$ (saat)	$14,75 \pm 3,89$	$13,08 \pm 1,18$	$9,54 \pm 0,61$	$13,63 \pm 2,37$	6-13 sa (Kothare ve diğerleri, 2017) (Coppola ve diğerleri, 2014)

Farmakokinetik veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde C_{max} değerlerinin Optimum 3DP tablet formülasyonunda referans ürün Inovelon® film tablete göre 20 mg/kg dozunda benzer ($p>0,05$), 40 mg/kg dozunda daha yüksek ($p<0,05$) olduğu görülmektedir. Bununla birlikte $AUC_{0-\infty}$ değerleri için her iki dozda da benzer değerler elde edilmiştir ($p>0,05$).

40 mg/kg doz için elde edilen yüksek C_{max} 'ın formülasyonda bulunan çözünürlük ve emilim artırıcı olarak bilinen Soluplus® ve sürfaktan yapısında lipit bazlı bir yardımcı madde olan

Gelucire® 48/16 ile oluşturulan katı dispersiyon sayesinde olduğu, bu maddelerin hem çözünürlük hem de emilimi artırmış olduğu düşünülmektedir (Zhang ve diğerleri, 2018). Bununla birlikte $AUC_{0-\infty}$ değerinde artış çalışılan dozlarda gözlenememiştir.

T_{max} değerleri incelendiğinde, 20 mg/kg dozda optimum 3DP tablet için bu değer Inovelon® film tableten daha uzun bulunmuştur ($p < 0,05$) (sırasıyla 3,00 saat ve 2,17 saattir). Elde edilen bu veriler literatür ile uyumludur (Kothare ve diğerleri, 2017; Coppola ve diğerleri, 2014). Bununla birlikte 40 mg/kg doz için elde edilen veriler arasında istatistiksel bir fark bulunmamaktadır ($p > 0,05$). In-vivo çalışmada elde edilen bu veri, in-vitro çözünme testi ile paralel elde edilmiştir. 200 mg dozda referans ürün in-vitro koşulda da daha hızlı çözünmektedir ve in-vivo'da da daha hızlı çözünüp maksimum konsantrasyona ulaşmıştır. Bununla birlikte 400 mg dozda yapılan in-vitro çözünme testinde benzer profiller elde edilmiş, in-vivo koşulda da etkin madde benzer hızla kana geçmiştir.

Bununla birlikte bulunan $T_{1/2}$ literatür ile (Kothare ve diğerleri, 2017; Coppola ve diğerleri, 2014) uyumlu olup 40 mg/kg dozda Inovelon® film tablete karşı optimum 3DP tablet için $T_{1/2}$ daha kısa (sırasıyla 9,54 saat ve 13,63 saat), kd daha yüksek (sırasıyla $0,07 \text{ saat}^{-1}$ ve $0,05 \text{ saat}^{-1}$) ve MRT daha kısa (sırasıyla 15,19 saat ve 22,18 saat) elde edilmiştir ($p < 0,05$). Elde edilen bu veriler 3DP tablet formülasyonunun fizyolojik koşullarda da daha hızlı çözüldüğü için çözünen etkin maddenin kan dolaşımından daha hızlı bir şekilde atılabildiğini düşündürmektedir. Sonuç olarak optimum 3DP formülasyonu ile yüksek dozda rufinamit uygulandığında (40 mg/kg), referans ürün Inovelon® film tablet'e göre daha yüksek C_{max} değeri elde edilmektedir.

İki ayrı doz için (20 mg/kg ve 40 mg/kg) elde edilen in-vivo sonuçlar, doz arttıkça test ürünün biyoyararlanımının daha belirgin şekilde artacağını göstermiştir. Benzer bulgu in-vitro çözünme deneyleri ile de elde edilmiş olup 200 mg dozda test ürün referans üründen daha hızlı çözünmezken artan çözünürlüğü sayesinde terapötik doz olan 1600 mg ($400 \text{ mg} * 4$ film tablet) dozda çözünme davranışı referans üründen çok daha yüksek elde edilmiştir. Terapötik doz olan 1600 mg'ın Wistar sıçanlarında toksik olması nedeniyle in-vivo deneyde değerlendirilememiştir. Daha büyük deney hayvanı türlerinde 1600 mg dozda optimum 3DP tablet formülasyonunun çok daha yüksek emileceği, bu sayede daha az doz ile ($< 1600 \text{ mg}$) referans ürünle aynı kan derişiminin elde edilebileceği, bu sayede doz azaltmanın söz konusu olabileceği düşünülmektedir.



6. SONUÇ

Tez çalışması sonucunda, risk analizi bazlı sistematik bir yaklaşımla uygun yardımcı maddeler seçilmiş ve rufinamit yüklü filamentler ile 3DP tabletler başarılı bir şekilde hazırlanmıştır. Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır:

- ✓ Hem denge çözünürlük çalışması hem de intrinsik çözünme çalışmaları, etkin maddenin sudaki çözünürlüğünün oldukça düşük, pH'dan bağımsız ve sürfaktan oranına bağımlı olduğunu göstermiştir.
- ✓ Formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddeler ile etkin maddenin fiziksel karışımı ve 3DP tablet prosesi sonucu elde edilen DSC termogramlarında, XRD difraktogramlarında ve FTIR spektrumlarında etkin madde ile yardımcı maddelerin geçimli olduğu, üretim prosesinin etkin maddenin fizikokimyasal yapısında bir değişikliğe neden olmadığı ve kristal yapısını koruyarak polimorfik değişime neden olmadığı gözlenmiştir.
- ✓ Formülasyon gelişimi çalışmalarında en uygun polimer karışımının “HPMC, Soluplus® ve Kollidon® VA 64” olduğu, plastikleştirici maddenin “Triasetin” olduğu tespit edilmiştir.
- ✓ Optimum plasebo formülasyonuna rufinamit eklenerek etkin madde yüklü filamentler hazırlanmış ve 3DP tabletler basılmıştır. Rufinamit yüklü 3DP tabletlerde çözünmeyi en fazla artıran sürfaktan maddenin “Gelucire® 48/16” olduğu ve maksimum %4 oranında kullanılabildiği görülmüştür.
- ✓ Kalitatif ve kantitatif içeriği tespit edilmiş optimum 3DP formülasyonunun çözünmesi üzerinde 3DP tasarımın etkisi incelenmiş olup en yüksek çözünmeye %50 iç dolgu oranı ve oblong şekilli tabletlerle ulaşılabileceği tespit edilmiştir.
- ✓ Üretim yönteminin çözünme üzerindeki etkisi incelendiğinde, optimum 3DP tablet formülasyonu ile birebir aynı yardımcı maddelerle hazırlanmış olmasına rağmen en düşük çözünmenin fiziksel karışım halinde hazırlanan konvansiyonel tablet ile elde edildiği gözlenmiştir. Bununla birlikte filament ekstrüzyonu esnasında erime sonucu meydana gelen katı dispersiyonun çözünmeyi artırdığı, ilaveten 3DP tasarım ile çözünmenin daha da yükseldiği tespit edilmiştir.
- ✓ Optimum formülasyon ve referans ürünün farklı dozlarında çözünmeleri karşılaştırılmış, elde edilen veriye göre 200 mg dozda referans ürün daha yüksek çözünme gösterirken terapötik doz olan 1600 mg dozda geliştirilen optimum

formülasyonun referans ürüne göre çok daha yüksek çözündüğü tespit edilmiştir. Dolayısıyla geliştirilmiş olan optimum 3DP tablet formülasyonundan etkin maddenin çözünmesinin terapötik dozlarda belirgin şekilde artmış olduğu tespit edilmiştir.

- ✓ Hazırlanan optimum 3DP tabletlerin fizikokimyasal stabilitesi $25\pm 2^{\circ}\text{C}/\%60\pm 5$ bağıl nem koşulunda 20 ay, $40\pm 2^{\circ}\text{C}/\%75\pm 5$ bağıl nem koşulunda 6 ay süresince stabil olduğu gözlenmiştir. Elde edilen bu veri optimum formülasyonun stabilite süresince kristal şeklinin değişmediğini göstermiştir.
- ✓ Gerçekleştirilen MTT sitotoksikite çalışmalarına göre geliştirilmiş olan optimum 3DP formülasyonunun hem Hep G2 hem de Caco-2 hücre hatlarında sitotoksik olmadığı tespit edilmiştir.
- ✓ Caco-2 hücre hattında gerçekleştirilen permeabilite deneyleri sonuçları incelendiğinde en yüksek permeabilitenin optimum 3DP formülasyonu ile elde edildiği gözlenmiştir. Referans ürüne kıyasla artan permeabilitenin, 3DP formülasyonunda kullanılan Gelucire® 48/16 ve Soluplus® gibi sürfaktan ve biyoyararlanım artırıcı özellikteki maddelerle yapılan katı dispersiyonlar sayesinde olduğu düşünülmektedir.
- ✓ Farmakokinetik veriler değerlendirildiğinde C_{max} değerlerinin optimum 3DP tablet formülasyonunda referans ürün Inovelon® film tablete göre 20 mg/kg dozu için istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmezken, 40 mg/kg dozunda daha yüksek olduğu görülmüştür ($p>0,05$). AUC verileri değerlendirildiğinde her iki doz için de istatistiksel bir fark gözlenmemiştir ($p > 0,05$). Bununla birlikte $T_{1/2}$ ve MRT değerlerinin 40 mg/kg dozunda istatistiksel olarak anlamlı ve daha kısa olduğu, kd değerinin ise istatistiksel olarak anlamlı ve daha yüksek olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$). Elde edilen bu sonuç optimum 3DP tabletin fizyolojik koşullarda daha hızlı çözünerek vücuttan daha hızlı atıldığını göstermektedir.
- ✓ Gerçekleştirilen tüm bu çalışmalar sayesinde terapötik dozu çok yüksek olan rufinamit etkin maddesi ile daha düşük dozlarda aynı etkinin sağlanabileceği, bununla birlikte yan etkilerinin azaltılabileceği 3DP tablet formülasyonları hazırlanarak “doz azaltma” yaklaşımının uygulanabileceği düşünülmektedir.
- ✓ Farklı geometri, şekil ve dozlarda bitmiş ürün üretimini mümkün kılan 3DP tablet üretim yöntemi ile özellikle dozlamanın çocuk ağırlığına bağlı olarak yapıldığı küçük çocuklarda rufinamit içeren “kişiye özel” tabletlerin üretilebileceği düşünülmektedir.
- ✓ Tez çalışmasında ticari preparata kıyasla daha düşük dozla etkili bir tedavi sağlayan 3DP tablet formülasyonu geliştirilmiş ve etkinliği in-vitro / in-vivo çalışmalarla kanıtlanmıştır.

KAYNAKLAR

- Agrawal, A., Dudhedia, M., Deng, W., Shepard, K., Zhong, L., Povilaitis, E., and Zimny, E. (2016). Development of tablet formulation of amorphous solid dispersions prepared by hot melt extrusion using quality by design approach. *The American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech*, 17(1), 214-232.
- Aho, J., Boetker, J. P., Baldursdottir, S., and Rantanen, J. (2015). Rheology as a tool for evaluation of melt processability of innovative dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*, 494, 623-642.
- Akdag, Y., Gulsun, T., Izat, N., Oner, L., and Sahin, S. (2020). Comparison of dissolution profiles and apparent permeabilities of commercially available metformin hydrochloride tablets in Turkey. *Dissolution Technologies*, 22-29.
- Aksu, B., Yozgatlı, V., Okur, M. E., Ayla, Ş., Yoltaş, A., & Okur, N. Ü. (2019). Preparation and evaluation of QbD based fusidic acid loaded in situ gel formulations for burn wound treatment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 52, 110–121.
- Alhnan, M. A., Okwuosa, T. C., Sadia, M., Wan, K. W., Ahmed, W., and Arafat, B. (2016). Emergence of 3D printed dosage forms: Opportunities and challenges. *Pharmaceutical Research*, 33, 1817-1832.
- Ali, W., Williams, A. C., and Rawlinson, C. F. (2010). Stoichiometrically governed molecular interactions in drug: Poloxamer solid dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*, 391, 162-168.
- Alizadeh, M. N., Shayanfar, A., and Jouyban, A. (2018). Solubilization of drugs using sodium lauryl sulfate: Experimental data and modeling. *Journal of Molecular Liquids*, 268, 410-414.
- Almeida, M., Magalhaes, M., Veiga, F., and Figueiras, A. (2018). Poloxamers, poloxamines and polymeric micelles: Definition, structure and therapeutic applications in cancer. *Journal of Polymer Research*, 25(31), 1-14.
- Alomari, M., Mohamed, F. H., Basit, A. W., and Gaisford, S. (2015). Personalised dosing: Printing a dose of one's own medicine. *International Journal of Pharmaceutics*, 494, 568-577.
- Al-Sheddi, E. S., Al-Oqail, M. M., Saquib, Q., Siddiqui, M. A., Musarrat, J., Al-Khedhairi, A. A., and Farshori, N. N. (2015). Novel all trans-retinoic acid derivatives: Cytotoxicity, inhibition of cell cycle progression and induction of apoptosis in human cancer cell lines. *Molecules*, 20, 8181-8197.
- Alshetali, A. S., Almutairy, B. K., Alshahrani, S. M., Ashour, E. A., Tiwari, R. V., Alshehri, S. M., Feng, X., Alsulays, B.B., Majumdar, S., Langley, N., Kolter, K., Gryczke, A., Martin, S.T., Repka, M. A. (2016). Optimization of hot melt extrusion parameters for sphericity and hardness of polymeric face-cut pellets. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 42(11), 1833–1841.

- Amidon, G. L., Lennernas, H., Shah, V. P., and Crison, J. R. (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in-vitro drug product dissolution and in-vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research*, 12(3), 413-420.
- Annapurna, M. M., Goutam, S. V. S., Saketha, C. N., and Pavani, S. (2012). New stability indicating liquid chromatographic method for the determination of rufinamide in presence of degradant products. *Drug Invention Today*, 4(10), 501-506.
- Antoni, D., Burckel, H., Josset, E., and Noel, G. (2015). Three-dimensional cell culture: A breakthrough in-vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), 5517-5527.
- Arafat, B., Wojsz, M., Isreb, A., Forbes, R. T., Isreb, M., Ahmed, W., Arafat, T., Alhnan, M. A. (2018). Tablet fragmentation without a disintegrant: A novel design approach for accelerating disintegration and drug release from 3D printed cellulosic tablets. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 118, 191-199.
- Arechabala, B., Coiffard, C., Rivalland, P., Coiffard, L. J. M., and Y., R. H. (1999). Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. *Journal of Applied Toxicology*, 19, 163-165.
- Artursson, P., Palm, K., and Luthman, K. (2001). Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46, 27-43.
- Artursson, P., Ungell, A. L., and Löfroth, J. E. (1993). Selective paracellular permeability in two models of intestinal absorption: cultured monolayers of human intestinal epithelial cells and rat intestinal segments. *Pharmaceutical Research*, 10(8), 1123-1129.
- Arzimanoglou, A., Ferreira, J. A., Satlin, A., Mendes, S., Williams, B., Critchley, D., Shuck, E., Hussein, Z., Kumar, D., Dhadda, S. Bibbiani, F. (2016). Safety and pharmacokinetic profile of rufinamide in pediatric patients aged less than 4 years with Lennox-Gastaut syndrome: An interim analysis from a multicenter, randomized, active-controlled, open-label study. *European Journal of Paediatric Neurology*, 20(3), 393-402.
- Asconape, J. J. (2018). Pharmacokinetic Considerations with the Use of Antiepileptic Drugs in Patients with HIV and Organ Transplants. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 18(12), 89.
- Atmaca, M. M., Baykan, B., Bebek, N., Gürses, C., and Gökyiğit, A. (2012). Lennox-Gastaut sendromunda intravenöz diazepam ile tetiklenen tonik status epileptikus. *Epilepsi*, 18(3), 38-42.
- Audus, K. L., Bartel, R. L., Hidalgo, I. J., and Borchardt, R. T. (1990). The use of cultured epithelial and endothelial cells for drug transport and metabolism studies. *Pharmaceutical Research*, 7(5), 435-449.
- Bahr, M. N., Modi, D., Patel, S., Campbell, G., and Stockdale, G. (2019). Understanding the role of sodium lauryl sulfate on the biorelevant solubility of a combination of poorly water-soluble drugs using high throughput experimentation and mechanistic absorption modeling. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22, 221-246.

- Banerjee, S., Shankar, K. R., and Prasad, R. (2015). Formulation development and systematic optimization of stabilized ziprasidone hydrochloride capsules devoid of any food effect. *Pharmaceutical Development and Technology*, 21(7), 775–786.
- Beck, R. C. R., Chaves, P. S., Goyanes, A., Vukosavljevic, B., Buanz, A., Windbergs, M., Basir, A.W., Gaisford, S. (2017). 3D printed tablets loaded with polymeric nanocapsules: An innovative approach to produce customized drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 528(1-2), 268-279. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.05.074
- Ben-Ari, Y. (2005). AES proceedings. *Epilepsia*, 46(8), 1-373.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., and Escalera, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76, 965–977.
- Bhutani, H., Kurmi, M., and Singh, B. (2014). A comparative account between traditional and QbD approach. *Pharma Times*, 46(8), 71-75.
- Bialer, M., Johannessen, S. I., Kupferberg, H. J., Levy, R. H., Loiseau, P., and Perucca, E. (1999). Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the fourth Eilat conference (EILAT IV). *Epilepsy Research*, 34(1), 1-41.
- Bialer, M., Johannessen, S. I., Levy, R. H., Perucca, E., Tomson, T., and White, H. S. (2013). Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the Eleventh Eilat Conference (EILAT XI). *Epilepsy Research*, 103(1), 2-30.
- Biganzoli, E., Cavenaghi, L. A., Rossi, R., Brunati, M. C., and Nolli, M. L. (1999). Use of a Caco-2 cell culture model for the characterization of intestinal absorption of antibiotics. *Il Farmaco*, 54, 594-599.
- Boetker, J., Water, J. J., Aho, J., Arnfast, L., Bohr, A., and Rantanen, J. (2016). Modifying release characteristics from 3D printed drug-eluting products. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90, 47-52.
- Bu, P., Narayanan, S., Dalrymple, D., Cheng, X., and Serajuddin, A. T. (2016). Cytotoxicity assessment of lipid-based self-emulsifying drug delivery system with Caco-2 cell model: Cremophor EL as the surfactant. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91, 162-171.
- Buanz, A. B. M., Belaunde, C. C., Soutari, N., Tuleu, C., Gul, M. O., and Gaisford, S. (2015). Ink-jet printing versus solvent casting to prepare oral films: Effect on mechanical properties and physical stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 494, 611-618.
- Bühler, V. (Editör). (2007). *Kollicoat grades, functional polymers for the pharmaceutical industry*. BASF, 15-65.
- Bühler, V. (Editör). (2008). *Kollidon, Polyvinylpyrrolidone excipients for the pharmaceutical industry* (9th ed.). BASF, 17-134.

- Cardot, J. M., Lecaillon, J. B., Czendlik, C., and Godbillon, J. (1998). The influence of food on the disposition of the antiepileptic rufinamide in healthy volunteers. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* 19(4), 259-262.
- Cerniglia, D., Scafidi, M., Pantano, A., and Rudlin, J. (2015). Inspection of additive-manufactured layered components. *Ultrasonics*, 62, 292-298.
- Chan, P. S., Zhang, C., Zuo, Z., Kwan, P., and Baum, L. (2014). In-vitro transport assays of rufinamide, pregabalin, and zonisamide by human P-glycoprotein. *Epilepsy Research*, 108(3), 359-366.
- Chatakonda, R., Gamidi, R. R., Anusha, P. S., Kumar, P. S., Thanukonda, N., and Lakshmi, K. V. (2012). Dissolution rate enhancement of an anti-convulsant drug. *Journal of Pharmacy Research*, 5(4), 2156-2158.
- Chellappa, M., Anjaneyulu, U., Manivasagam, G., and Vijayalakshmi, U. (2015). Preparation and evaluation of the cytotoxic nature of TiO₂ nanoparticles by direct contact method. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 31-41.
- Cheng, K. C., Li, C., Hsieh, Y., Montgomery, D., Liu, T., and White, R. E. (2006). Development of a high-throughput in-vitro assay using a novel Caco-2/rat hepatocyte system for the prediction of oral plasma area under the concentration versus time curve (AUC) in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 53(3), 215-218.
- Cheung, W. K., Kianifard, F., Wong, A., Mathieu, J., Cook, T., John, V., Redalieu, E., Chan, K. (1995). Intra- and inter-subject variabilities of CGP 33101 after replicate single oral doses of two 200-mg tablets and 400-mg suspension. *Pharmaceutical Research*, 12(12), 1878-1882.
- Coppola, G., Besag, F., Cusmai, R., Dulac, O., Kluger, G., Moavero, R., Nabbout, R., Nikanorova, M., Pisani, F., Verrotti, A., Stülpnagel, C. V., Curatolo, P. (2014). Current role of rufinamide in the treatment of childhood epilepsy: literature review and treatment guidelines. *European Journal of Paediatric Neurology*, 18(6), 685-690.
- Crison, J. R., Weiner, N. D., and Amidon, G. (1997). Dissolution media for in-vitro testing of water-insoluble drugs: effect of surfactant purity and electrolyte on in-vitro dissolution of carbamazepine in aqueous solutions of sodium lauryl sulfate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86(3), 384-388.
- Critchley, D. J., Aluri, J., Boyd, P., Whayman, M., Narurkar, M., Delargy, H., and Bibbiani, F. (2011). Bioavailability of three rufinamide oral suspensions compared with the marketed 400-mg tablet formulation: results from a randomized-sequence, open-label, four-period, four-sequence crossover study in healthy subjects. *Clinical Therapeutics*, 33(1), 146-157.
- Dalvi, A. V., Uppuluri, C. T., Bommireddy, E. P., and Ravi, P. R. (2018). Design of experiments-based RP - HPLC bioanalytical method development for estimation of Rufinamide in rat plasma and brain and its application in pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1102-1103, 74-82.

- Deeks, E. D., and Scott, L. J. (2006). Rufinamide. *Central Nervous System Drugs*, 20(9), 751-760.
- Deepak, M., Basavaraj, N., and Manvi, F. V. (2013). Formulation and characterization of tamoxifen loaded stealth liposomes for breast cancer. *International Journal of Drug Development & Research*, 5(1), 1-10.
- Dezani, A. B., Pereira, T. M., Caffaro, A. M., Reis, J. M., Helena, C., and Serra, R. (2013). Equilibrium solubility versus intrinsic dissolution: characterization of lamivudine, stavudine and zidovudine for BCS classification. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(4), 853-863.
- Douroumis, D., Bouropoulos, N., and Fahr, A. (2007). Physicochemical characterization of solid dispersions of three antiepileptic drugs prepared by solvent evaporation method. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 59(5), 645-653.
- EC. (2000). (EC) No 141/2000: Orphan medicinal products. In (pp. 1-5): Official Journal of the European Communities.
- EC. (2020). (EC) No 847/2000: Laying down the provisions for implementation of the criteria for designation of a medicinal product as an orphan medicinal product and definitions of the concepts ‘similar medicinal product’ and ‘clinical superiority’. Official Journal of the European Communities, *Lüksemburg*, 1-4.
- Elbadawi, M., Castro, B. M., Gavins, F. K. H., Ong, J. J., Gaisford, S., Pérez, G., Basit, A. W., Cabalar, P., Goyanes, A. (2020). M3DISEEN: A novel machine learning approach for predicting the 3D printability of medicines. *International Journal of Pharmaceutics*, 590, 1-12.
- Elsayed, E. A., Sharaf-Eldin, M. A., and Wadaan, M. (2015). In-vitro evaluation of cytotoxic activities of essential oil from moringa oleifera seeds on HeLa, HepG2, MCF-7, CACO-2 and L929 Cell Lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(11), 4671-4675.
- EMA. (1995). ICH Q2 (R1): Validation of analytical procedures: Text and methodology. EMA, *Amsterdam*, 1-15.
- EMA. (2012). ICH Q11: Development and manufacture of drug substances (chemical entities and biotechnological/ biological entities). EMA, *Amsterdam*, 1-29.
- EMA. (2015). ICH Q10: Pharmaceutical quality system. EMA, *Amsterdam*,. 1-20.
- EMA. (2015). ICH Q9: Quality risk management. EMA, *Amsterdam*, 1-20.
- EMA. (2017). ICH Q8 (R2): Pharmaceutical development. EMA, *Amsterdam*, 1-24.
- EMA. (2018). ICH Q14: Analytical Procedure Development and Revision of Q2(R1) Analytical Validation. EMA, *Amsterdam*, 1-3.
- EMA. (2020). ICH Q12: Technical and regulatory considerations for pharmaceutical product lifecycle management. EMA, *Amsterdam*, 1-31.

- Etherson, K., Dunn, C., Matthews, W., Pamelund, H., Barragat, C., Sanderson, N., Izumi, T., Mathews, C. C., Halbert, G., Wilson, C., McAllister, M., Mann, J., Ostergaard, J., Butler, J., Khadra, I. (2020). An interlaboratory investigation of intrinsic dissolution rate determination using surface dissolution. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 150, 24-32.
- FDA. (2004). Guidance for Industry PAT — A framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing, and quality assurance. FDA. *Silver spring, MD*, 1-19.
- FDA. (2008). Banzel summary of product characteristics. FDA. *Silver spring, MD*, 1-20.
- FDA. (2011). Quality by design for ANDAs: An example for modified release dosage forms. FDA. *Silver spring, MD*, 1-161.
- FDA. (2012). Quality by design for ANDAs: An example for immediate-release dosage forms. FDA. *Silver spring, MD*, 1-107.
- FDA. (2017). Technical considerations for additive manufactured medical devices. FDA. *Silver spring, MD*, 1-31.
- FDA. (2018). Guidance for industry, bioanalytical method validation. FDA. *Silver spring, MD*, 1-44.
- FDA. (2020). Banzel Prescribing information. FDA. *Silver spring, MD*, 1-28.
- Fernandes, M. B., Goncalves, J. E., Scotti, M. T., de Oliveira, A. A., Tavares, L. C., and Storpirtis, S. (2012). Caco-2 cells cytotoxicity of nifuroxazide derivatives with potential activity against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Toxicology In-Vitro*, 26(3), 535-540.
- Ferrec, E., Chesne, C., Artusson, P., Brayden, D., Fabre, G., Gires, P., Guillou, F., Rousset, M., Rubas, W., Scarino, M. L. (2001). In-vitro models of the intestinal barrier. *Alternatives to laboratory animals*, 29, 649–668.
- Fisichella, M., Dabboue, H., Bhattacharyya, S., Saboungi, M. L., Salvetat, J. P., Hevor, T., and Guerin, M. (2009). Mesoporous silica nanoparticles enhance MTT formazan exocytosis in HeLa cells and astrocytes. *Toxicology In-Vitro*, 23, 697-703.
- Gajera, B. Y., Shah, D. A., and Dave, R. H. (2018). Investigating a novel hot melt extrusion-based drying technique to solidify an amorphous nanosuspension using design of experiment methodology. *The American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech*, 19(8), 3778-3790.
- Gall, Z., Vancea, S., Dogaru, M. T., and Szilagyi, T. (2013). Liquid chromatography-mass spectrometric determination of rufinamide in low volume plasma samples. *Journal of Chromatography B*, 940, 42-46.
- Gall, Z., Vancea, S., Szilagyi, T., Gall, O., and Kolcsar, M. (2015). Dose-dependent pharmacokinetics and brain penetration of rufinamide following intravenous and oral administration to rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68, 106-113.

- Garza, J. E. P., Boyce, D., Tworek, D. M., Davis, K. A., Gatens, H., Lai, G., McGoldrick, P. E., Thomas, B., Wolf, S. M. (2019). The refractory epilepsy screening tool for Lennox–Gastaut syndrome (REST-LGS). *Epilepsy & Behavior*, 90, 148-153.
- Genina, N., Boetker, J. P., Colombo, S., Harmankaya, N., Rantanen, J., and Bohr, A. (2017). Anti-tuberculosis drug combination for controlled oral delivery using 3D printed compartmental dosage forms: From drug product design to in-vivo testing. *Journal of Controlled Release*, 268, 40-48.
- Gioumouxouzis, C., Katsamenis, O. L., Bouropoulos, N., and Fatouros, D. G. (2017). 3D printed oral solid dosage forms containing hydrochlorothiazide for controlled drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 40, 164-171.
- Goyanes, A., Buanz, A. B., Basit, A. W., and Gaisford, S. (2014). Fused-filament 3D printing (3DP) for fabrication of tablets. *International Journal of Pharmaceutics*, 476(1-2), 88-92.
- Goyanes, A., Buanz, A. B., Hatton, G. B., Gaisford, S., and Basit, A. W. (2015). 3D printing of modified-release aminosalicylate (4-ASA and 5-ASA) tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 89, 157-162.
- Goyanes, A., Chang, H., Sedough, D., Hatton, G. B., Wang, J., Buanz, A., Gaisford, S., Basit, A. W. (2015). Fabrication of controlled-release budesonide tablets via desktop (FDM) 3D printing. *International Journal of Pharmaceutics*, 496(2), 414-420.
- Goyanes, A., Fernández-Ferreiro, A., Majeed, A., Gomez-Lado, N., Awad, A., Luaces-Rodríguez, A., Gaisford, S., Aguiar, P., Basit, A. W. (2018). PET/CT imaging of 3D printed devices in the gastrointestinal tract of rodents. *International Journal of Pharmaceutics*, 536, 158-164.
- Goyanes, A., Fina, F., Martorana, A., Sedough, D., Gaisford, S., and Basit, A. W. (2017). Development of modified release 3D printed tablets (printlets) with pharmaceutical excipients using additive manufacturing. *International Journal of Pharmaceutics*, 527(1-2), 21-30.
- Goyanes, A., Robles Martinez, P., Buanz, A., Basit, A. W., and Gaisford, S. (2015). Effect of geometry on drug release from 3D printed tablets. *International Journal of Pharmaceutics*, 494(2), 657-663.
- Goyanes, A., Scarpa, M., Kamlow, M., Gaisford, S., Basit, A. W., and Orlu, M. (2017). Patient acceptability of 3D printed medicines. *International Journal of Pharmaceutics*, 530(1-2), 71-78.
- Gültekin, H. E., Tort, S., and Acartürk, F. (2019). An effective technology for the development of immediate release solid dosage forms containing low-dose drug: Fused deposition modeling 3D printing. *Pharmaceutical Research*, 36(128), 1-13.
- Gültekin, H. E., Tort, S., Tugcu-Demiroz, F., & Acarturk, F. (2021). 3D printed extended release tablets for once daily use: An in-vitro and in-vivo evaluation study for a personalized solid dosage form. *International Journal of Pharmaceutics*, 596, 120222.

- Hardung, H., Djuric, D., and Ali, S. (2010). Combining HME & solubilization: Soluplus® the solid solution. *Drug Delivery Technology*, 1(3), 1-7.
- Harisudha, K., Lavanya, G., Eswarudu, M. M., Eswaraiah, M. C., Spandana, B. N., and Sunil, M. (2013). RP-HPLC Method development and validation for estimation of rufinamide in bulk and its pharmaceutical dosage form. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, 3(2), 392-397.
- Hitzer, P., Bäuerle, T., Paulsen, K., Drieschner, T., Lishaut, H., Ostertag, E., Paulsen, K., Lishaut, H. V., Lorenz, G., Rebner, K. (2017). Process analytical techniques for hot-melt extrusion and their application to amorphous solid dispersions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409, 4321-4333.
- Howland, R. D., and Mycek, M. J. (2009). *Lippincott's illustrated reviews: Farmakoloji* (3 ed.). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 143-150.
- Hull, C. W. (1986) Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography, US 4575330, 1-16.
- Hussain, A., Watts, C., and Buhse, L. (2005). *DARPA & FDA – Collaborating to Ensure National Security through Radical Innovation in Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Regulatory Process*. FDA, Silver Spring MD., 1-12.
- Hutchinson, D. J., Liou, Y., Best, R., and Zhao, F. (2010). Stability of extemporaneously prepared rufinamide oral suspensions. *Ann Pharmacother*, 44(3), 462-465.
- Ingels, F. M., and Augustijns, P. F. (2003). Biological, pharmaceutical and analytical considerations with respect to the transport media used in the absorption screening system, Caco-2. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92(8), 1545-1558.
- Ingels, F., Deferme, S., Destexhe, E., Oth, M., Van den Mooter, G., and Augustijns, P. (2002). Simulated intestinal fluid as transport medium in the Caco-2 cell culture model. *International Journal of Pharmaceutics*, 232, 183-192.
- Islam, M. T., Maniruzzaman, M., Halsey, S. A., Chowdhry, B. Z., and Douroumis, D. (2014). Development of sustained-release formulations processed by hot-melt extrusion by using a quality-by-design approach. *Drug Delivery and Translational Research*, 4, 377-387.
- Islam, M. T., Scoutaris, N., Maniruzzaman, M., Moradiya, H. G., Halsey, S. A., Bradley, M. S. A., Chowdhry, B. Z., Snowden, M.J., Douroumis, D. (2015). Implementation of transmission NIR as a PAT tool for monitoring drug transformation during HME processing. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 96, 106-116.
- Isreb, A., Baj, K., Wojsz, M., Isreb, M., Peak, M., and Alhnan, M. A. (2019). 3D printed oral theophylline doses with innovative 'radiator-like' design: Impact of polyethylene oxide (PEO) molecular weight. *International Journal of Pharmaceutics*, 564, 98-105.
- Issa, M. G., and Ferraz, H. G. (2011). Intrinsic dissolution as a tool for evaluating drug solubility in accordance with the biopharmaceutics classification system. *Dissolution Technologies*, 6-13.

- İnternet: 3dprint. (2015). You Can Now See the First Ever 3D Printer — Invented by Chuck Hull — In the National Inventors Hall of Fame. Web: <https://3dprint.com/72171/first-3d-printer-chuck-hull/>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Abitec. (2015). *Acconon C-50 EP/NF Technical data sheet*. Web: <https://www.abiteccorp.com/en/>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Aitken, M. (2014). *Global Outlook for Medicines Through 2018*. Web: <https://www.quotidianosanita.it/allegati/allegato6540948.pdf> Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Aksungur, P. (2017). TİTCK Perspektifi ile Ulusal Mevzuat, İhtiyaçlar. Web: <https://prezi.com/zizgvkwp7f5x/titck-perspektifi-ile-ulusal-mevzuat-ihitiyaclar/>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Allen, L. V. (2016). 3D Printing: Pharmacy Applications Part 1: Introduction and Applications. Web: https://compoundingtoday.com/Newsletter/Science_and_Tech_1601.cfm, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Aprecia. (2020). ZipDose Technology, Spritam. Web: <https://www.aprecia.com/technology/zipdose>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Ashland. (2014). *Plasdone K-29/32 polymer, Technical information*. Web: <https://www.ashland.com/>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Ashland. (2017). *Klucel hydroxypropylcellulose, Physical and chemical properties*. Web: https://www.ashland.com/file_source/Ashland/Product/Documents/Pharmaceutical/P_C_11229_Klucel_HPC.pdf, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Ashland. (2019). *Klucel EXF Certificate of analysis*. Web: <https://www.ashland.com/>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Ashland. (2019). *Klucel EXF, hydroxypropylcellulose brochure*. Web: <https://www.ashland.com/>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: BASF. (2011). *Excipient Innovation - What Else?* Web: <https://www.basf.com/tr/tr.html>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: BASF. (2013). *New formulas for successful drug delivery, Hot-melt extrusion for enhanced solubility and bioavailability*. Web: <https://www.basf.com/tr/tr.html>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: BASF. (2015). *PEG-6, Pluriol E300 technical information*. Web: <https://www.basf.com/tr/tr.html>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: BASF. (2016). *Kolliphor PS Grades, Technical information*. Web: <https://www.basf.com/tr/tr.html>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: BASF. (2019). *Soluplus Technical information*. Web: <https://www.basf.com/tr/tr.html>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.

- İnternet: BASF. (2020). *Accelerators, Kollidon CL grades*. Web: <https://www.basf.com/tr/tr.html>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: BASF. (2020). *Chremophor EL*. Web: <https://www.basf.com/tr/tr.html>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: BASF. (2020). *Kolliphor EL*. Web: <https://www.basf.com/tr/tr.html>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: BASF. (2020). *Ludiflash – The taste of success*. Web: <https://www.basf.com/tr/tr.html>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Ben-Anat, I. (2013). QbD implementation in Generic Industry: Overview and Case-Study. Web: <http://qbdworks.com/wp-content/uploads/2014/06/QbD-Generics-Teva.pdf>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Biogrand. (2017). *HME Cleaner Plus (GMP) Processing guide for cleaning equipment after extrusion*. Web: <https://www.biogrand.com/>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Biogrand. (2017). *HME Cleaner Plus (GMP) Specification*. Web: <https://www.biogrand.com/>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Campos-Castelló, J. (2004). *Lennox-Gastaut syndrome (LGS)*. Web: <https://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-Lennox.pdf>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: CNN. (2014). The night I invented 3D printing. Web: <https://edition.cnn.com/2014/02/13/tech/innovation/the-night-i-invented-3d-printing-chuck-hall/index.html>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Cyprotex. (2021). Caco-2 Permeability Assay. Web: <https://www.cyprotex.com/admepk/in-vitro-permeability/caco-2-permeability>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Design-Expert. (2001) *Design-Expert 6 User's Guide, Section 11 – Statistical Details: Design Selection*. Web: Design-Expert: <https://www.statease.com/>
- İnternet: Dow. (2020). *Affinisol HPMC HME for Hot Melt Extrusion*. Web: <https://tr.dow.com/tr-tr.html>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Dow. (2020). *Carbowax Sentry, Polyethylene Glycol (PEG) 8000 Technical data sheet*. Web: <https://tr.dow.com/tr-tr.html>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Dow. (2020). *Carbowax, Polyethylene Glycol (PEG) 4000 Technical Data Sheet*. Web: <https://tr.dow.com/tr-tr.html>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: EMA. (2007). *Inovelon scientific discussion*. Web: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-discussion/inovelon-epar-scientific-discussion_en.pdf, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.

- İnternet: EMA. (2007). *Public summary of positive opinion for orphan designation of rufinamide for the treatment of Lennox-Gastaut syndrome*. Web: https://www.ema.europa.eu/en/documents/orphan-designation/eu/3/04/240-public-summary-positive-opinion-orphan-designation-rufinamide-treatment-lennox-gastaut-syndrome_en.pdf, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: EMA. (2012). *Inovelon Film Tablet and Suspension, Annex I, Summary of product characteristics*. Web: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/inovelon-epar-product-information_en.pdf, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: EMA. (2020). Orphan designation: Overview. Web: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/orphan-designation-overview>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: eMC. (2020). Inovelon Suspension Summary of product characteristics (SmPC). Web: <https://www.medicines.org.uk/emc/product/2354/smpc/print>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: eMC. (2020). Inovelon Tablets Summary of product characteristics (SmPC). Web: <https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/20165/SPC/>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Epilepsyfoundation. (2020). Lennox-Gastaut Syndrome (LGS). Web: <https://www.epilepsy.com/learn/types-epilepsy-syndromes/lennox-gastaut-syndrome-lgs>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: EPO. (2014). Charles W. Hull: Winner of the European Inventor Award 2014 in the category Non-European countries. Web: <https://www.epo.org/news-events/events/european-inventor/finalists/2014/hull.html>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: EvaluatePharma. (2017). *Orphan Drug Report 2017*. Web: <http://info.evaluategroup.com/rs/607-YGS-364/images/EPOD17.pdf>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Evonik. (2019). *Eudragit EPO Certificate of analysis*. Web: <https://www.evonik.com.tr/tr>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Evonik. (2020). *Eudragit brochure*. Web: <https://www.evonik.com.tr/tr>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: FDA. (2002). 107th Congress Public Law 280, Rare diseases act of 2002. Web: <https://www.govinfo.gov/content/pkg/PLAW-107publ280/html/PLAW-107publ280.htm>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: FDA. (2020). Office of orphan products development. Web: <https://www.fda.gov/about-fda/office-clinical-policy-and-programs/office-orphan-products-development>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.

- İnternet: FDA. (2020). Rufinamide dissolution method. Web: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_SearchResults.cfm, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: FDA. (2020). Rufinamide, Orphan Drug Designation. Web: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/opdlisting/oopd/detailedIndex.cfm?cfgridkey=193504>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: FDA. (2021). Dissolution Methods. Web: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_getallData.cfm, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Filabot. (2017). *Dyna-Purge D2 Material safety data sheet*. Web: <https://www.filabot.com/>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Fiminska, Z. (2014). Volume to Value: A shift in pharma's business. Web: <https://www.reutersevents.com/pharma/evidence/volume-value-shift-pharmas-business-model>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Gattefosse. (2015). *Gelucire 48/16, Solubility and oral bioavailability enhancement*. Web: <https://www.gattefosse.com/>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Gattefosse. (2015). *Lipid Based Formulations for oral bioavailability enhancement formulation guidelines*. Web: , Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Gattefosse. (2019). *Gelucire 44/14, Self-emulsifying excipient for solubility and oral bioavailability enhancement*. Web: <https://www.gattefosse.com/>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Gattefosse. (2020). *Gelucire 50/13*. Web: <https://www.gattefosse.com/pharmaceuticals-products/gelucire-5013>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Gosnear, T. (2016). Three Big Risks in 3D Printing Pharmaceuticals. Web: <https://www.pharmamanufacturing.com/articles/2016/three-big-risks-in-3d-printing-pharmaceuticals/>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Group, C. B. W. (2009). *A-MAB: A case study in bioprocess development*. Web: https://cdn.ymaws.com/www.casss.org/resource/resmgr/imported/a-mab_case_study_version_2-1.pdf, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Guardian, T. (2014). Chuck Hull: the father of 3D printing who shaped technology. Web: <https://www.theguardian.com/business/2014/jun/22/chuck-hull-father-3d-printing-shaped-technology>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Hipolite, W. (2015). These 3D Printable Tools Help You Understand Infill percentages, number of shells and more. Web: <https://3dprint.com/82668/infill-shells-3d-printing/>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Kassam, Z. (2017). UK bioscience companies form Rare Disease Industry Group. Web: <https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/news/64331/rare-diseases-medicines-access-improved/>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.

İnternet: Medscape. (2020). Lennox-Gastaut Syndrome. Web: <https://emedicine.medscape.com/article/1176735-overview>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.

İnternet: Mouldsplus. (2020). *Ultra Purge*. Web: <https://www.moulds.biz/>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.

İnternet: NIH. (2018). *Rufinamide Livertox*. Web: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548457/pdf/Bookshelf_NBK548457.pdf, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.

İnternet: NIH. (2020). Lennox-Gastaut syndrome. Web: <https://medlineplus.gov/genetics/condition/lennox-gastaut-syndrome/>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.

İnternet: Notman, N. (2018). Seeing drugs in 3D. Web: <https://www.chemistryworld.com/features/3d-printing-in-pharma/3008804.article>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.

İnternet: Orphanet. (2020). Orphan drugs in Japan. Web: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Education_AboutOrphanDrugs.php?lng=EN&stapage=ST_EDUCATION_EDUCATION_ABOUTORPHANDRUGS_JAP, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.

İnternet: Orphanet. (2020). Orphanet Türkiye. Web: <http://www.orpha.net/national/TR-TR/index/orphanet-t%C3%BCrkiye/>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.

İnternet: Parietti, F. (2019). How we 3D print your whole prescription into one pill. Web: <https://multiplylabs.com/about>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.

İnternet: Pharmaceutical Technology. (2017). Aprelia Pharmaceuticals and Cycle Pharmaceuticals Partner to Develop 3D-Printed Orphan Drugs. Web: <https://www.pharmtech.com/view/aprelia-pharmaceuticals-and-cycle-pharmaceuticals-partner-develop-3d-printed-orphan-drugs>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.

İnternet: Pubchem. (2020). Beta-cyclodextrin compound summary. Web: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/444041>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.

İnternet: Pubchem. (2020). Corn starch compound summary. Web: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/24836924>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.

İnternet: Pubchem. (2020). Diethylene glycol monoethyl ether compound summary. Web: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diethylene-glycol-monoethyl-ether>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.

İnternet: Pubchem. (2020). Polysorbate 80 compound summary. Web: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Polysorbate-80>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.

- İnternet: Pubchem. (2020). Sodium dodecyl sulfate compound summary. Web: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3423265>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Pubchem. (2020). Triacetin compound summary. Web: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5541>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Pubchem. (2020). Triethyl citrate compound summary. Web: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6506>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Roquette. (2020). *Kleptose HPB Oral Grade product specification sheet*. Web: <https://www.roquette.com/>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Roquette. (2020). *Pearlitol Flash Mannitol-Maize Starch Compound*. Web: <https://www.roquette.com/>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Roquette. (2020). *Pearlitol, Mannitol for pharmaceutical applications*. Web: <https://www.roquette.com/>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Sigma-Aldrich. (2020). *Di(ethylene glycol) ethyl ether*. Web: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w509043?lang=en®ion=TR>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: T.C.Cumhurbaşkanlığı. (2020). *Eklemeli İmalat Yol Haritası*. Web: https://arge.ssb.gov.tr/Documents/Eklemeli_%C4%B0malat_Teknolojileri_OTAG_Sonuc_Raporu.pdf, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: TITCK. (2020). Yurtdışı ilaç listesi (Geçerlik tarihi: 16.11.2020). Web: <https://www.titck.gov.tr/dinamikmodul/44>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: TRI. (2017). *Research Announcement*. Web: <https://media.bcm.edu/documents/2017/aa/tri-research-topics-final.pdf>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Wandera, O. R. (2013). *Formulation development of generic rufinamide uncoated tablets*. (Master of Pharmacy in Industrial Pharmacy). School of Pharmacy, University of Nairobi, Web: http://erepository.uonbi.ac.ke/bitstream/handle/11295/95294/Ososo_Formulation%20Development%20Of%20Generic%20Rufinamide%20Uncoated%20Tablets.pdf?sequence=6, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Webmd. (2020). Lennox-Gastaut Syndrome. Web: <https://www.webmd.com/epilepsy/lennox-gastaut#1>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Wikipedia. (2020). Chuck Hull. Web: https://en.wikipedia.org/wiki/Chuck_Hull, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.
- İnternet: Worldofchemicals. (2020). Corn starch properties. Web: <https://www.worldofchemicals.com/chemicals/chemical-properties/corn-starch.html>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2020.

- Jaboori, A. H. J., and Oyewumi, M. O. (2015). 3D printing technology in pharmaceutical drug delivery: Prospects and challenges. *Journal of Biomolecular Research & Therapeutics*, 4(4), 1-3.
- Jacob, J., Coyle, N., West, T. G., Monkhouse, D. C., Surprenant, H. L., and Jain, N. B. (2016). *US 9339489 B2, Rapid disperse dosage form containing levetiracetam*. Princeton: U. S. Patent, 1-20.
- Jain, A., Ran, Y., and Yalkowsky, S. H. (2004). Effect of pH-sodium lauryl sulfate combination on solubilization of PG300995 (an Anti-HIV Agent): A technical note. *The American Association of Pharmaceutical Scientists Pharmaceutical Technology*, 5(3), 1-3.
- Jamroz, W., Kurek, M., Lyszcza, E., Szafraniec, J., Knapik-Kowalczyk, J., Syrek, K., Paluch, M., Jachowicz, R. (2017). 3D printed orodispersible films with Aripiprazole. *International Journal of Pharmaceutics*, 533(2), 413-420.
- Jannin, V., Chevrier, S., Michenaud, M., Dumont, C., Belotti, S., Chavant, Y., and Demarne, F. (2015). Development of self emulsifying lipid formulations of BCS class II drugs with low to medium lipophilicity. *International Journal of Pharmaceutics*, 495, 385-392.
- Javadzadeh, Y., Adibkia, K., Hamishekar, H., Ghafourian, T., Nokhodchi, A., and Kaialy, W. (2015). *Percutaneous penetration enhancers chemical methods in penetration enhancement, modification of the stratum corneum*. Belgrad: Springer, 195-205.
- Joseph, J. R., Schultz, R. J., and Wilfong, A. A. (2011). Rufinamide for refractory epilepsy in a pediatric and young adult population. *Epilepsy Research*, 93(1), 87-89.
- Khaled, S. A., Burley, J. C., Alexander, M. R., Yang, J., and Roberts, C. J. a. (2015). 3D printing of tablets containing multiple drugs with defined release profiles. *International Journal of Pharmaceutics*, 494, 643-650.
- Khan, M. (2016). *Emerging Technologies: Pharmaceutical Product Development with 3D Printing*. AAPS National Meeting, Denver, Colorado, 1-16.
- Khuri, A., and Mukhopadhyay, S. (2010). Response surface methodology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 2(2), 128-149.
- Kim, S. H., Kang, H. C., Lee, J. S., and Kim, H. D. (2018). Rufinamide efficacy and safety in children aged 1-4years with Lennox-Gastaut syndrome. *Brain and Development*, 40(10), 897-903.
- Kishore, R. S. K., Pappenberger, A., Dauphin, I. B., Ross, A., Buergi, B., Steampfli, A., and Mahler, H. C. (2011). Degradation of Polysorbates 20 and 80: Studies on Thermal Autoxidation and Hydrolysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(2), 721-731.
- Koçkaya, G., Wertheimer, A. I., Kilic, P., Tanyeri, P., Vural, M., Akbulat, A., Artiran, G., Kerman, S. (2014). An overview of the orphan medicines market in Turkey. *Value in Health Regional Issues*, 4C, 47-52.

- Kollamaram, G., Croker, D. M., Walker, G. M., Goyanes, A., Basit, A. W., and Gaisford, S. (2018). Low temperature fused deposition modeling (FDM) 3D printing of thermolabile drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 545, 144-151.
- Kollipara, S., Bende, G., Movva, S., and Saha, R. (2010). Application of rotatable central composite design in the preparation and optimization of poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for controlled delivery of paclitaxel. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 36(11), 1377-1387.
- Kolter, K., Karl, M., Gryczke, A. (Editörler). (2012). *Hot-Melt Extrusion with BASF Pharma Polymers, Extrusion Compendium* (2nd ed.). BASF. 10-100.
- Kothare, S., Kluger, G., Sachdeo, R., Williams, B., Olhaye, O., Perdomo, C., and Bibbiani, F. (2017). Dosing considerations for rufinamide in patients with Lennox-Gastaut syndrome: Phase III trial results and real-world clinical data. *Seizure*, 47, 25-33.
- Kumar, B. S. P., Annapurna, M. M., and Pavani, S. (2013). Development and validation of a stability indicating RP-HPLC method for the determination of Rufinamide. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 3(1), 66-70.
- Kyobula, M., Adedeji, A., Alexander, M. R., Saleh, E., Wildman, R., Ashcroft, I., Gellert, P. R., Roberts, C. J. (2017). 3D inkjet printing of tablets exploiting bespoke complex geometries for controlled and tuneable drug release. *The Journal of Controlled Release*, 261, 207-215.
- la Marca, G., Rosati, A., Falchi, M., Malvagia, S., Della Bona, M. L., Pellacani, S., and Guerrini, R. (2013). A pharmacokinetic study and correlation with clinical response of rufinamide in infants with epileptic encephalopathies. *Pharmacology*, 91(5-6), 275-280.
- Lavicoli, I., Leso, V., Fontana, L., and Bergamaschi, A. (2011). Toxicological Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles: A Review of In-vitro mammalian studies. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 15, 481-508.
- Li, C., Liu, T., Cui, X., Uss, A. S., and Cheng, K. C. (2007). Development of in-vitro pharmacokinetic screens using Caco-2, human hepatocyte, and Caco-2/human hepatocyte hybrid systems for the prediction of oral bioavailability in humans. *Journal of Biomolecular Screening*, 12(8), 1084-1091.
- Liu, P., Wulf, O. D., Laru, J., Heikkilä, T., van Veen, B., Kiesvaara, J., Laaksonen, T. (2013). Dissolution studies of poorly soluble drug nanosuspensions in non-sink conditions. *American Association of Pharmaceutical Scientists Pharmaceutical Technology*, 14(2), 748-756.
- Ligon, S. C., Liska, R., Stampfl, J., Gurr, M., and Mülhaupt, R. (2017). Polymers for 3D printing and customized additive manufacturing. *Chemical Reviews*, 117, 10212-10290.
- Malaquias, L. F. B., Schulte, H. L., Chaker, J. A., Karan, K., Durig, T., Marreto, R. N., Gratieri, T., Gelfuso, G.M., Cunha-Filho, M. (2018). Hot melt extrudates formulated using design space: One simple process for both palatability and dissolution rate improvement. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 107(1), 286-296.

- Masood, S. H. (2007). Application of fused deposition modelling in controlled drug delivery devices. *Assembly Automation*, 27(3), 215-221.
- Maulvi, F. A., Shah, M. J., Patel, A. S., Soni, T. G., and Shah, D. O. (2017). Application of 3D Printing technology in the development of novel drug delivery systems. *International Journal of Drug Development and Research*, 9(1), 44-49.
- Mazzucchelli, I., Rapetti, M., Fattore, C., Franco, V., Gatti, G., and Perucca, E. (2011). Development and validation of an HPLC-UV detection assay for the determination of rufinamide in human plasma and saliva. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(3), 1013-1021.
- McCormack, P. L. (2012). Rufinamide: a pharmacoeconomic profile of its use as adjunctive therapy in Lennox-Gastaut syndrome. *Pharmacoeconomics*, 30(3), 247-256.
- Melocchi, A., Parietti, F., Maroni, A., Foppoli, A., Gazzaniga, A., and Zema, L. (2016). Hot-melt extruded filaments based on pharmaceutical grade polymers for 3D printing by fused deposition modeling. *International Journal of Pharmaceutics*, 509, 255-263.
- Milani, P. Z., Jalali, M. B., Azimi, M., and Valizadeh, H. (2009). Biopharmaceutical classification of drugs using intrinsic dissolution rate (IDR) and rat intestinal permeability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 73, 102-106.
- Moradiya, H. G., Islam, M. T., Scoutaris, N., Halsey, S. A., Chowdhry, B. Z., and Douroumis, D. (2016). Continuous Manufacturing of High Quality Pharmaceutical Cocrystals Integrated with Process Analytical Tools for In-Line Process Control. *Crystal Growth and Design*, 16, 3425-3434.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.
- Motz, S. A., Schaefer, U. F., Balbach, S., Eichinger, T., and Lehr, C. M. (2007). Permeability assessment for solid oral drug formulations based on Caco-2 monolayer in combination with a flow through dissolution cell. *The European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 66(2), 286-295.
- Mura, P., Moyano, J. R., González-Rodríguez, M. L., Rabasco-Alvaréz, A. M., Cirri, M., and Maestrelli, F. (2005). Characterization and dissolution properties of ketoprofen in binary and ternary solid dispersions with polyethylene glycol and surfactants. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 31, 425-434.
- Mutlu, N. B., Degim, Z., Yilmaz, S., Essiz, D., and Nacar, A. (2011). New perspective for the treatment of Alzheimer diseases: liposomal rivastigmine formulations. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 37(7), 775-789.
- Nair, A. B., and Jacob, S. (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 7(2), 27-31.

- Neuhoff, S., Ungell, A. L., Zamora, I., and Artursson, P. (2003). pH-dependent bidirectional transport of weakly basic drugs across Caco-2 monolayers: implications for drug-drug interactions. *Pharmaceutical Research*, 20, 1141-1148.
- Norman, J., Madurawe, R. D., Moore, C. M., Khan, M. A., and Khairuzzaman, A. (2017). A new chapter in pharmaceutical manufacturing: 3D-printed drug products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 108, 39-50.
- Nowrouzi, A., Meghraz, K., Golmohammadi, T., Golestani, A., Ahmadian, S., Shafiezhadeh, M., Shajary, Z., Khaghani, S., Amiri, A. N. (2010). Cytotoxicity of subtoxic AgNP in human hepatoma cell line (HepG2) after long-term exposure. *Iranian Biomedical Journal*, 14(1-2), 23-32.
- Ohtsuka, Y., Yoshinaga, H., Shirasaka, Y., Takayama, R., Takano, H., and Iyoda, K. (2014). Rufinamide as an adjunctive therapy for Lennox-Gastaut syndrome: a randomized double-blind placebo-controlled trial in Japan. *Epilepsy Research*, 108(9), 1627-1636.
- Okwuosa, T. C., Stefaniak, D., Arafat, B., Isreb, A., Wan, K. W., and Alhnan, M. A. (2016). A lower temperature FDM 3D printing for the manufacture of patient-specific immediate release tablets. *Pharmaceutical Research*, 33, 2704-2712.
- Ozgüney, I., Shuwisitkul, D., & Bodmeier, R. (2009). Development and characterization of extended release Kollidon® SR mini-matrices prepared by hot-melt extrusion. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 73, 140-145.
- Ölmez, S. S. (2010). *Klozapin içeren ağızda dağılan tablet formülasyonu geliştirilmesi, in-vitro ve in-vivo yöntemlerle değerlendirilmesi*. Ankara: Hacettepe Üniversitesi, 3-56.
- Pade, V., and Stavchansky, S. (1997). Estimation of the relative contribution of the transcellular and paracellular pathway to the transport of passively absorbed drugs in the Caco-2 cell culture model. *Pharmaceutical Research*, 14, 1210-1215.
- Papadopoulou, V., Kosmidis, K., Vlachou, M., and Macheras, P. (2006). On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics*, 309, 44-50.
- Parikh, T., Gupta, S. S., Meena, A., and Serajuddin, A. T. M. (2014). Investigation of thermal and viscoelastic properties of polymers relevant to hot melt extrusion - III: Polymethacrylates and polymethacrylic acid based polymers. *Journal of Excipients and Food Chemistry*, 5(1), 56-64.
- Parlati, C., Colombo, P., Buttini, F., Young, P. M., Adi, H., Ammit, A. J., and Traini, D. (2009). Pulmonary Spray Dried Powders of Tobramycin Containing Sodium Stearate to Improve Aerosolization Efficiency. *Pharmaceutical Research*, 26(5), 1084-1092.
- Patel, A., Patwari, A., and Suhagia, B. (2014). Development of a validated stability-indicating HPTLC method for rufinamide in bulk and its pharmaceutical dosage form. *Journal of Chromatographic Science*, 52(10), 1294-1301.

- Patwardhan, K., Asgarzadeh, F., Dassinger, T., Albers, J., and Repka, M. A. (2015). A quality by design approach to understand formulation and process variability in pharmaceutical melt extrusion processes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67, 673–684.
- Pawar, J., Suryawanshi, D., Moravkar, K., Aware, R., Shetty, V., Maniruzzaman, M., and Amin, P. (2018). Study the influence of formulation process parameters on solubility and dissolution enhancement of efavirenz solid solutions prepared by hot-melt extrusion: a QbD methodology. *Drug Delivery and Translational Research*, 8, 1644–1657.
- Peraman, R., Bhadraya, K., and Reddy, P. (2015). Analytical quality by design: A tool for regulatory flexibility and robust analytics. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2015, 1-9.
- Perucca, E., Cloyd, J., Critchley, D., and Fuseau, E. (2008). Rufinamide: clinical pharmacokinetics and concentration-response relationships in patients with epilepsy. *Epilepsia*, 49(7), 1123-1141.
- Ph.Eur. (2018). *Basic butylated methacrylate copolymer*. Strasburg: European Pharmacopoeia, 1925-1926
- Ph.Eur. (2020). 2.9.36. *powder flow*. Strasburg: European Pharmacopoeia, 362-365
- Pietro, A., Dario, P., and Gabriele, R. (2012). Process for the purification of rufinamide. Patent No. EP2518057A1. E. p. office. *Baranzate*, 1-15.
- Pietrzak, K., Isreb, A., and Alhnan, M. A. (2015). A flexible-dose dispenser for immediate and extended release 3D printed tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 96, 380-387.
- Pinto, E. C., Cabral, L. M., and Sousa, V. P. (2014). Development of a Discriminative Intrinsic Dissolution Method for Efavirenz. *Dissolution Technologies*, 31-40.
- Portman, R., Hoffmeier, U. C., Burkhard, A., Scherrer, W., and Szelagiewicz, M. (2011). Crystal modification of 1-(2,6Difluorobenzyl)-1H-1,2,3-Triazole-4-Carboxamide and dosage forms and formulations thereof. U. s. Patent US 8076362 B2,. *Basel*, 1-9.
- Portman, R., Hoffmeier, U. C., Burkhard, A., Sherrer, W., and Szelagiewicz, M. (2004). Crystal modification of 1-(2,6difluorobenzyl)-1H-1,2,3-triazole-4carboxamide and its use as antiepileptic. U. S. Patent. US 6740669 B1, *Basel*, 1-8.
- Portman, R., Hofmeier, U. C., Burkhard, A., Scherrer, W., and Szelagiewicz, M. (2010). Crystal modifications of 1-(2,6-Difluorobenzyl)-1H-1,2,3-Triazole-4-Carboxamide. U. s. Patent US 7750028 B2, *Basel*, 1-11.
- Probst, J. B., Möltgen, C. V., Kessler, W., and Kessler, R. W. (2016). Process design and control of a twin screw hot melt extrusion for continuous pharmaceutical tamper-resistant tablet production. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87, 14-21.

- Ravish, J. P., and Dhara, D. (2013). Preparation and characterization of rufinamide HP- β -cyclodextrin complexes prepared by the kneading method for solubility enhancement. *Ars Pharmaceutica*, 54(1), 33-38.
- Reddy, B. P., Reddy, K. R., Reddy, D. M., Reddy, K. S. C., and Krishna, B. V. (2015). Rufinamide solid dispersion. U. s. Patent US 20150182458 A1, *Hyderabad*, 1-6
- Reintjes, T. (Editör). (2011). *Solubility enhancement with BASF Pharma polymers, solubilizer compendium*. BASF. 67-117.
- Repka, M. A., Bandari, S., Kallakunta, V. R., Vo, A. Q., McFall, H., Pimparade, M. B., and Bhagurkar, A. M. (2018). Melt extrusion with poorly soluble drugs – An integrated review. *International Journal of Pharmaceutics*, 535(1-2), 68-85.
- Repka, M. A., Gerding, T. G., Repka, S. L., and McGinity, J. W. (1999). Influence of plasticizers and drugs on the physical mechanical properties of hydroxypropylcellulose films prepared by hot melt extrusion. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25(5), 625-633.
- Rijkevorsel, K. V. (2008). Treatment of Lennox-Gastaut syndrome: overview and recent findings. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 4(6), 1001–1019.
- RxMediaPharma. (2020). *Rufinamit*. İzmir: RxMedia Pharma, 1-2.
- Sadia, M., Arafat, B., Ahmed, W., Forbes, R. T., and Alhnan, M. A. (2018). Channelled tablets: An innovative approach to accelerating drug release from 3D printed tablets. *Journal of Controlled Release*, 269, 355-363.
- Saydam, M., and Takka, S. (2019). Bioavailability File: Rufinamide. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44(3), 231-242.
- Saydam, M., and Takka, S. (2020). Improving the dissolution of a water-insoluble orphan drug through a fused deposition modelling 3-Dimensional printing technology approach. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 152, 105426.
- Seithel, A., Karlsson, J., Hilgendorf, C., Björquist, A., and Ungell, A. L. (2006). Variability in mRNA expression of ABC- and SCL-transporters in human intestinal cells: Comparison between human segments and Caco-2 cells. *Eur Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28, 291-299.
- Shah, P., Jogani, V., Bagchi, T., and Misra, A. (2006). Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. *Biotechnology Progress*, 22, 186–198.
- Shekunov, B. (2017). Theoretical analysis of drug dissolution in micellar media. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106, 258-257.
- Siepmann, J., and Siepmann, F. (2020). Sink conditions do not guarantee the absence of saturation effects. *International Journal of Pharmaceutics*, 577, 1-11.
- Simoes, M. F., Pinto, R. M. A., and Simoes, S. (2019). Hot-melt extrusion in the pharmaceutical industry: toward filing a new drug application. *Drug Discovery Today*, 24(9), 1749-1768.

- Singh, J., Sangwan, S., Grover, P., Mehta, L., Kiran, D., and Goyal, A. (2013). Analytical method development and validation for assay of rufinamide drug. *Journal of Pharmaceutical Technology, Research and Management*, 1(2), 191-203.
- Siswanto, A., Fudholi, A., Nugroho, A. K., and Martono, S. (2015). In-vitro release modeling of aspirin floating tablets using DDSolver. *Indonesian Journal of Pharmaceutics*, 26(2), 94-102.
- Skowrya, J., Pietrzak, K., and Alhnan, M. A. (2015). Fabrication of extended-release patient-tailored prednisolone tablets via fused deposition modelling (FDM) 3D printing. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68, 11-17.
- Solanki, N. G., Tahsin, M. D., Shah, A. V., and Serajuddin, A. T. M. (2018). Formulation of 3D printed tablet for rapid drug release by fused deposition modeling: screening polymers for drug release, drug-polymer miscibility and printability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 107, 390-401.
- Steffansen, B., Nielsen, C. U., Brodin, B., Eriksson, A. H., Andersen, R., and Frokjaer, S. I. (2004). Intestinal solute carriers: an overview of trends and strategies for improving oral drug absorption. *Eur Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21, 3-16.
- Stepanenko, A. A., and V.V., D. (2015). Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene*, 1-35.
- STM. (2016). Katmanlı imalat teknolojileri ve havacılık uygulamaları sektör değerlendirme raporu. *Ankara*, 1-22.
- Swaan, P. W. (1998). Recent advances in intestinal macromolecular drug delivery via receptor-mediated transport pathways. *Pharmaceutical Research*, 15, 826-834.
- Szabó, Z. I., Gál, R., Gáll, Z., Vancea, S., Rédei, E., Fülöp, I., Sipos, E., Donath-Nagy, G., Npszal, B., Tóth, G. (2017). Cyclodextrin complexation improves aqueous solubility of the antiepileptic drug, rufinamide: solution and solid state characterization of compound-cyclodextrin binary systems. *The Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 88, 43-52.
- Thiry, J., Lebrun, P., Vinassa, C., Adam, M., Netchacovitch, L., Ziemons, E., Hubert, P., Krier, F., Evrard, B. (2016). Continuous production of itraconazole-based solid dispersions by hot melt extrusion: Preformulation, optimization and design space determination. *International Journal of Pharmaceutics*, 515, 114–124.
- Thurein, S. M., Lertsuphotvanit, N., and Phaechamud, T. (2018). Physicochemical properties of beta-cyclodextrin solutions and precipitates prepared from injectable vehicles. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(5), 438-449.
- Tsukatani, T., Higuchi, T., Suenaga, H., Akao, T., Ishiyama, M., Ezoe, T., and Matsumoto, K. (2009). Colorimetric microbial viability assay based on reduction of water-soluble tetrazolium salts for antimicrobial susceptibility testing and screening of antimicrobial substances. *Analytical Biochemistry*, 393, 117–125.

- Tyson, A. L., Hilton, S. T., and Andreae, L. C. (2015). Rapid, simple and inexpensive production of custom 3D printed equipment for large-volume fluorescence microscopy. *International Journal of Pharmaceutics*, 494, 651-656.
- USP. (2011). Rufinamide safety data sheet. USP 40. *Rockville, MD.*, 1-7.
- USP. (2020). Rufinamide tablet. USP 43. *Rockville, MD.*, 1-6.
- USP. (2020). Rufinamide. USP 43. *Rockville, MD.*, 1-2.
- USP. (2021). { 1087 } Apparent intrinsic dissolution - Dissolution testing procedures for rotating disk and stationary disk. USP 43. *Rockville, MD.*, 1-6.
- USP. (2021). { 1092 } The dissolution procedure: Development and validation. USP 43. *Rockville, MD.*, 1-20.
- Vakili, H., Kolakovic, R., Genina, N., Marmion, M., Salo, H., Ihalainen, P., Peltonen, J., Sandler, N. (2015). Hyperspectral imaging in quality control of inkjet printed personalised dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(1-2), 244-249.
- van Breemen, R. B., and Li, Y. (2005). Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 1(2), 175-185.
- van Rijckevorsel, K. (2008). Treatment of Lennox-Gastaut syndrome: overview and recent findings. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 4(6), 1001-1019.
- Varan, C., Wickström, H., Sandler, N., Aktaş, Y., and Bilensoy, E. (2017). Inkjet printing of antiviral PCL nanoparticles and anticancer cyclodextrin inclusion complexes on bioadhesive film for cervical administration. *International Journal of Pharmaceutics*, 531, 701-713.
- Vasconcelos, T., Sarmiento, B., and Costa, P. (2007). Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug Discovery Today*, 12(23/24), 1068-1075.
- Vasoya, J. M., Desai, H. H., Gumaste, S. G., Tillotson, J., Kelemen, D., Dalrymple, D. M., and Serajuddin, A. T. M. (2019). Development of solid dispersion by hot melt extrusion using mixtures of polyoxylglycerides with polymers as carriers for increasing dissolution rate of a poorly soluble drug model. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 108(2), 888-896.
- Vendrame, M., Loddenkemper, T., Gooty, V. D., Takeoka, M., Rotenberg, A., Bergin, A. M., Eksioglu, Y. Z., Poduri, A., Duffy, F. H., Libenson, M., Bpurgeois, B. F., Kothare, S. V. (2010). Experience with rufinamide in a pediatric population: a single center's experience. *Pediatric Neurology*, 43(3), 155-158.
- Ventola, C. L. (2014). Medical Applications for 3D Printing: Current and Projected Uses. *P&T*, 39(10), 704-711.

- Verstraete, G., Samaro, A., Grymonpré, W., Vanhoorne, V., Snick, B. V., Boone, M. N., Hellemans, T., Hoorebeke, L. V., Remon, J. P., Vervaet, C. (2018). 3D printing of high drug loaded dosage forms using thermoplastic polyurethanes. *International Journal of Pharmaceutics*, 536, 318-325.
- Viegas, T. X., Curatella, R. U., Winkle, L. L. V., and Brinker, G. (2001). Measurement of intrinsic drug dissolution rates using two types of apparatus. *Pharmaceutical Technology*, 44-53.
- Vithani, K., Goyanes, A., Jannin, V., Basit, A. W., Gaisford, S., and Boyd, B. J. (2019). A Proof of concept for 3d printing of solid lipid-based formulations of poorly water-soluble drugs to control formulation dispersion kinetics. *Pharmaceutical Research*, 36(102), 1-13.
- Vo, N. L. G., Park, C., and Lee, B. J. (2013). Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85, 799-813.
- Wagner, S., Münzer, S., Behrens, P., Scheper, T., Bahnemann, D., and Kasper, C. (2009). Cytotoxicity of titanium and silicon dioxide nanoparticles. *Journal of Physics: Conference Series*, 170, 1-8.
- Wang, H., Cheng, H., Wang, F., Wei, D., and Wang, X. (2010). An improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of *Escherichia coli* cells. *Journal of Microbiological Methods*, 82, 330-333.
- Ward, P. D., Tippin, T. K., and Thakke, D. R. (2000). Enhancing paracellular permeability by modulating epithelial tight junctions. *Pharm Sci Technol Today*, 3(10), 346-358.
- Wheless, J. W., and Vazquez, B. (2010). Rufinamide: a novel broad-spectrum antiepileptic drug. *Epilepsy Currents*, 10(1), 1-6.
- White, H. S., Franklin, M. R., Kupferberg, H. J., Schmutz, M., Stables, J. P., and Wolf, H. H. (2008). The anticonvulsant profile of rufinamide (CGP 33101) in rodent seizure models. *Epilepsia*, 49(7), 1213-1220.
- Wier, H. A., Cerna, A., and So, T. Y. (2011). Rufinamide for pediatric patients with Lennox-Gastaut syndrome: a comprehensive overview. *Paediatr Drugs*, 13(2), 97-106.
- Wood, J. H., Syarto, J. E., and Letterman, H. (1965). Improved holder for intrinsic dissolution rate studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54(7), 1068.
- Wright, H. M., Chen, A. V., Martinez, S. E., and Davies, N. M. (2012). Pharmacokinetics of oral rufinamide in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 35(6), 529-533.
- Xu, M., Ni, Y., Zhou, Y., He, X., Li, H., Chen, H., and Li, W. (2016). Pharmacokinetics and tolerability of rufinamide following single and multiple oral doses and effect of food on pharmacokinetics in healthy chinese subjects. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 41(5), 541-548.

- Yamashita, S., Furubayashi, T., Kataoka, M., Sakane, T., Sezaki, H., and Tokuda, H. (2000). Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *Eur Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(3), 195-204.
- Yee, S. (1997). In-vitro permeability across caco 2 cells (colonic) can predict in-vivo (small intestine) absorption in man-Fact or Myth. *Pharmaceutical Research*, 14, 763-766.
- Yerlikaya, F., Ozgen, A., Vural, I., Guven, O., Karaagaoglu, E., Khan, M. A., & Capan, Y. (2013). Development and evaluation of paclitaxel nanoparticles using a quality-by-design approach. *Journal of pharmaceutical sciences*, 102(10), 3748-3761.
- Yu, L. X., Carlin, A. S., Amidon, G. L., and Hussain, A. S. (2004). Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 270, 221-227.
- Yücel, Ç. (2015). *Embriyonik kök hücre ve insülin taşıyan lipozom, nanopartikül ve kohleat formülasyonlarının geliştirilerek etkinliğinin incelenmesi*. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 5-46.
- Zhang, J., Feng, X., Patil, H., Tiwari, R. V., and Repka, M. A. (2017). Coupling 3D printing with hot-melt extrusion to produce controlled-release tablets. *International Journal of Pharmaceutics*, 519(1-2), 186-197.
- Zhang, X., Xing, H., Zhao, Y., and Ma, Z. (2018). Pharmaceutical dispersion techniques for dissolution and bioavailability enhancement of poorly water-soluble drugs. *Pharmaceutics*, 10(74), 1-33.
- Zhao, J., Xu, X., Wang, M., and Wang, L. (2018). A new model of a 3d-printed shell with convex drug release profile. *Dissolution Technologies*, 24-28.
- Zolgharnein, J., Shahmoradi, A., and Ghasemi, J. B. (2013). Comparative study of Box–Behnken, central composite, and Doehlert matrix for multivariate optimization of Pb (II) adsorption onto Robinia tree leaves. *Journal of Chemometrics*, 27, 12-20.



EKLER

EK-1. Etik kurul onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 14/03/2019-E.34144



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı


* B E Z E 6 L Y F 5 *

Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof. Dr. Sevgi TAKKA
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Sevgi TAKKA, Mürşide Ayşe DEMİREL ve Mehtap SAYDAM'dan oluşan G.Ü.ET-19.013 kod numaralı ve *"Üç Boyutlu Baskı Tekniği ile Yetim İlaç İçeren Katı İlaç Formülasyonlarının Tasarımla Kalite (QbD) Prensiplerine Dayanılarak Geliştirilmesi"* başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-19.013 and entitled *"Development of 3D printed solid dosage formulations containing orphan drug using quality by design (QbD) principles"* is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Hayvan Türü : Sıçan Wistar Albino
Hayvan Sayısı : 24

Ek: 1 Liste

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : SAYDAM, Mehtap

Uyruğu : TC

Doğum tarihi ve yeri :

Medeni hali

Kimlik No

e-mail

Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet yılı
Doktora	Eczacılık/Farmasötik Teknoloji	2015-Devam ediyor
Yüksek Lisans	Eczacılık/Farmasötik Teknoloji	2007-2010
Lisans	Gazi Üniversitesi / Eczacılık Fakültesi	2003-2007
Lise	Gölbaşı Anadolu Lisesi, Ankara	1997-2003

İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
01.2019 - (devam ediyor)	DROGSAN İLAÇ SANAYİİ A.Ş.	Ar-Ge Müdürü
05.2015 - 01.2019	DROGSAN İLAÇ SANAYİİ A.Ş.	Ar-Ge Proje Yöneticisi
11.2010 - 05.2015	SANOVEL İLAÇ SANAYİİ A.Ş.	Ar-Ge Uzmanı
09.2009 - 10.2010	DROGSAN İLAÇ SANAYİİ A.Ş.	Ar-Ge Proje Yöneticisi
07.2007 - 09.2009	DROGSAN İLAÇ SANAYİİ A.Ş.	Ar-Ge Formülasyon Uzmanı

Yabancı Dil

İngilizce (İleri)

İspanyolca (A1)

Yayınlar

- Saydam M., (2016). Association of Quality by design tools with biopharmaceutical classification system, *ISPE Pharmaceutical Magazine*, 03-04.
- Saydam M., Takka S. (2007). Bioavailability file: Valsartan, *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32, 185-196.
- Saydam M., Takka S. (2018). Development and in-vitro evaluation of pH-independent release matrix tablet of weakly acidic drug valsartan using quality by design tools. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 44, 1905-17.
- Saydam M., Takka S. (2019). Bioavailability File: Rufinamide. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44(3), 231-242,
- Saydam M., Takka S. (2020). Improving the dissolution of a water-insoluble orphan drug through a fused deposition modelling 3-Dimensional printing technology approach. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 152,105426,

Uluslararası Sempozyum, Kongre veya Konferans Bildirileri

- Eraslan, E., Demirbaş, Ö. Inözü, M. Dolaksız, Y.E., Saydam, M. ve Arisoy, M. (2018, 17 – 19 September). *Risk based pharmaceutical development of an electrolyte-containing Polythylene glycol (PEG) aqueous oral solution for constipation treatment*. 19th International Pharmaceutical Technology Symposium-IPTS, Antalya.
- Saydam, M. (2013). *Case Study: Establishing statistics method and DoE to make QbD practice more effective*. CPHI Quality by Design, Shanghai, China.
- Saydam, M. (2013). *İstatistiksel deney tasarımı ve farmasötik ürün geliştirmede kullanımı*. Sanovel, İstanbul.
- Saydam, M. (2015). Case study: Developing and production of sterile dosage forms according to QbD approach (<http://www.pharma-kongress.com/>), Pharma Kongress, Düsseldorf, Germany.
- Saydam, M. (2015). Development of sterile dosage forms according to quality by design (QbD) principles. *Journal of Pharmaceutics & Drug Delivery Research*, 3(3), 70.
- Saydam, M. (2017). *Quality improvement methods and Quality by Design*. Swiss Consulting, İstanbul.
- Saydam, M. (2017). *Statistical evaluations in pharmaceutical industry*. Swiss Consulting, İstanbul.
- Saydam, M., Takka, S. (2018). *Risk based development of orphan drugs by using an emerging manufacturing technology: 3 dimensional printing (3dp) within the emergent quality improvement perspective: quality by design (QbD)*. IFPAC, Washington DC, USA.

Saydam, M., Takka, S. (2018, 17 –19 September). *Development of solid dosage forms of an orphan drug with 3 dimensional printing (3DP) By using quality by design (Qbd) tools.* 19th International Pharmaceutical Technology Symposium-IPTS, Antalya.

Saydam, M., Takka, S. (2019). *Improving the solubility and dissolution of a water insoluble orphan drug with 3 dimensional printing (3DP).* 8th BBBB International Conference on Pharmaceutical Sci., Abstract Book. 67-69, İzmir.

Takka, S., Saydam, M. (2015). *Application of quality by design (qbd) tools and biopharmaceutical classification system (BCS) in developing ph-independent controlled release matrix tablet.* 1st Gazi Pharma Symposium Series, Antalya.

Patentler

İnözü, M., Demirbaş, Ö., Saydam, M., Talay, Ç., Arısoy, M., Dolaksız, Y.E. (2020). Melazma tedavisinde kullanılan yarı katı farmasötik kompozisyonlar, Ankara, TR 2020/13443, (inceleme aşamasındadır).

Türkyılmaz, A., Turp, H., Saydam, M. (2012). Oral Pharmaceutical Formulations Comprising Dabigatran, *İstanbul*, EP 2722034 A1, (inceleme aşamasındadır).

Türkyılmaz, A., Turp, H., Saydam, M. (2012). Solid oral formulations of prasugrel, *İstanbul*, EP 2722036 A1, (inceleme aşamasındadır).

Cifter, Ü., Türkyılmaz, A., Saydam, M., Tombayoğlu, V. (2011). Combinations of valsartan and amlodipine, *İstanbul*, EP 2494963 A1, EP 2494964 A1, (inceleme aşamasındadır).

Cifter, Ü., Türkyılmaz, A., Yelken, G., Saydam, M. (2011). Orally-Disintegrating Formulations of Vildagliptin, *İstanbul*, EP 2572704 A1, (inceleme aşamasındadır).

Cifter, Ü., Türkyılmaz, A., Yelken, G., Saydam, M. (2010). Bilayer Combination Composition of Vildagliptin and Gliclazide, *İstanbul*, EP 2468267 A1, (inceleme aşamasındadır).

Cifter, Ü., Türkyılmaz, A., Karaköy, B., Saydam, M., Ergenekon, E. (2010). Combinations of vildagliptin and glimepiride, *İstanbul*, EP 2468256 B1, (inceleme aşamasındadır).

Cifter, Ü., Türkyılmaz, A., Saydam, M., Ergenekon, E. (2010). Vildagliptin Formulations, *İstanbul*, EP 2468361 B1, (inceleme aşamasındadır).

Cifter, Ü., Türkyılmaz, A., Yelken, G., Saydam, M. (2010). Combination composition of vildagliptin and gliclazide, *İstanbul*, EP 2468268 A1, (inceleme aşamasındadır).

Cifter, Ü., Türkyılmaz, A., Yelken, G., Saydam, M. (2010). Effervescent formulations of vildagliptin, *İstanbul*, EP 2550957 A1, (inceleme aşamasındadır).

Hobiler

Kitap okumak, seyahat etmek, koşmak, yoga.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR...

