

Stabilnost prazikvantela pri mehanokemijskoj aktivaciji mljevenjem

Šagud, Ivana

Professional thesis / Završni specijalistički

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:645399>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ivana Šagud

STABILNOST PRAZIKVANTELA PRI MEHANOKEMIJSKOJ AKTIVACIJI
MLJEVENJEM

Specijalistički rad

Zagreb, 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ivana Šagud

STABILNOST PRAZIKVANTELA PRI MEHANOKEMIJSKOJ AKTIVACIJI
MLJEVENJEM

Specijalistički rad

Zagreb, 2023.

PSS studij: Poslijediplomski specijalistički studij Razvoj lijekova

Mentor rada: red. prof. dr. sc. Mario Jug

Specijalistički rad obranjen je dana

Pred povjerenstvom u sastavu:

1. izv. prof. dr. sc. Jasna Jablan

2. prof. dr. sc. Mario Jug

3. nasl. izv. prof. dr. sc. Biserka Cetina Čižmek

Rad ima 60 listova.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom red. prof. dr. sc. Marija Juga.

Zahvaljujem se profesoru Mariju Jugu na pomoći tijekom izrade rada i svim vrijednim savjetima i znanju koje mi je prenio.

Zahvalila bih se i prof. Škorić, bivšoj suradnici i trajnoj prijateljici s Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu na prvoj prilici koju mi je dala da zajedno surađujemo na problematici stabilnosti prazikvantela.

Najveća hvala mojoj obitelji, Martinu i Andreju, što iz godine u godinu, trpe i podržavaju moju nezasitnu želju za znanjem i rastom.

SAŽETAK

Cilj istraživanja

Predloženo istraživanje razmatra potencijal primjene mehanokemijske aktivacije mljevenjem za modifikaciju nepovoljnih fizikalno-kemijskih karakteristika prazikvantela s ciljem povećanja topljivosti i oralne bioraspoloživosti lijeka. U fokusu istraživanja je stabilnost prazikvantela te razgradni produkti koji nastaju tijekom njegove mehanokemijske aktivacije mljevenjem, sa ili bez aditiva. Razmatrani mehanizmi nastanka razgradnih produkata prazikvantela dat će uvid u kritične točke mehanokemijske aktivacije koje je moguće modificirati u budućim istraživanjima, olakšati selekciju povoljnijih aditiva za mljevenje te omogućiti procjenu potencijala primjene mehanokemije za povećanje topljivosti teško topljivih lijekova. Ova saznanja mogu biti od velike važnosti u razvoju suvremenih formulacija s kontroliranim i ciljanim oslobađanjem lijekova niske topljivosti te tako omogućiti učinkovitiju terapiju kao i proširenje terapijskih indikacija lijekova.

Materijali i metode

U istraživanju su korišteni podaci dostupni u publikacijama ostvarenim kroz vlastita istraživanja te pretraživanjem literaturnih baza podataka prema tematici relevantnoj za izradu specijalističkog rada od općih prema specijaliziranim člancima. Podaci su proučeni kritički obzirom na problematiku kemijske i fotokemijske nestabilnosti prazikvantela prilikom mehanokemijske aktivacije.

Rezultati

Mehanokemijska aktivacija pokazala se prikladnom metodom za pripremu produkata s poboljšanim farmaceutsko-tehnološkim i biofarmaceutskim svojstvima prazikvantela. Produkti uključuju nove polimorfne oblike, polimerne disperzije, kokristale i inkluzijske komplekse prazikvantela koji imaju potencijal unaprijediti terapiju shistosomijaze.

Prazikvantel pri određenim uvjetima, pokazuje sklonost razgradnji te su identificirani određeni razgradni produkti nastali tijekom mljevenja uz različite aditive. Teorijski pretpostavljena razgradnja reakcijom oksidacije dokazana je i eksperimentalno dobivenim transformacijskim

produktima čiji najvjerojatniji mehanizmi nastanka uključuju reakcije oksidacije, katalizirane svjetlom ili temperaturom.

Identificirani razgradi produkti u eksperimentima *in silico* ispitivani su na mutageni/kancerogeni potencijal, što je vrlo važna informacija za sigurnost primjene produkata prazikvantela pripremljenih mehanokemijskom aktivacijom.

Zaključak

Obzirom na sklonost prazikvantela oksidativnoj razgradnji pri određenim uvjetima, kod planiranja i optimiranja daljnjih eksperimenata trebalo bi osigurati zaštitu reakcijske smjese od svjetla i temperature, s obzirom da eksperimentalni i teorijski podaci pokazuju da je oksidacija prazikvantela katalizirana upravo tim čimbenicima.

Obzirom da se mljevenje provodi u metalnim, hermetički zatvorenim posudama te je tretirani uzorak zaštićen od svjetla, potrebno je osigurati učinkovitije metode praćenja i održavanja niskih temperatura tijekom mehanokemijske sinteze. Kriogeni uvjeti možda nisu nužni, ali temperature ispod sobne čine se poželjnima.

Drugi kritični čimbenik je sam kisik. Obzirom da se veliki broj operacija usitnjavanja i u samoj industriji provodi u inertnoj atmosferi, eksperimente mljevenja gdje je došlo do razgradnje, trebalo bi ponoviti na način da se prethodno aparatura propuše argonom ili dušikom i hermetički zatvori. Ovakav put planiranja daljnjih istraživanja mogao bi dati nove uvide u same mehanizme razgradnje prazikvantela te omogućiti razvoj učinkovitih procesa mehanokemijske aktivacije lijeka u većem mjerilu.

SUMMARY

Objectives

Proposed research deals with the potential application of mechanochemical activation by grinding in the improvement of unfavorable physico-chemical characteristics of Praziquantel, namely in the enhancement of solubility and oral bioavailability of the drug. The focal point of the research is to give detailed insights into degradation products formed during the mechanochemical activation by grinding Praziquantel with and without additives. The studied mechanisms of degradation of Praziquantel in these conditions will give insights into critical parameters of the process. These critical parameters can then be further modified in future research, the selection of additives can be made easier and the potential of mechanochemical activation for enhancement of solubility of insoluble drugs can thus be better utilized. These findings are of importance in the future development of formulations with controlled and targeted release of drugs with low solubility. This can then make the therapeutic effects of insoluble drugs better and therapeutic indications broader.

Materials and Methods

The data that was used in the research was compiled partially from personal collaborative research on the topic and partly by searching the common databases by the theme that is relevant to the thesis, grading the knowledge from more common to more specialized. All of the gathered data was studied and critically evaluated based on the issues concerning the chemical and photochemical instability of praziquantel during the mechanochemical activation by grinding.

Results

Mechanochemical activation has been shown as an appropriate method for the preparation of products with enhanced pharmaceutical and biopharmaceutical properties of Praziquantel. Products that can be obtained by the method are new polymorphic forms, polymorphic

dispersions, cocrystals and inclusion complexes. These new praziquantel products have the potential to advance anthelmintic therapy.

Praziquantel has shown a tendency for degradation when placed under certain conditions. Some of the degradation products that were formed in the conditions of mechanochemical grinding of praziquantel with additives have been identified. The theoretically proposed mechanism of oxidation has been experimentally proven to be catalyzed by light and temperature. The identified degradation products have been tested *in silico* for their mutagenic/carcinogenic potential, as this is an important information when it comes to the safety of application of the products of praziquantel that would be obtained by mechanochemical activation.

Conclusions

Considering the tendency for oxidative degradation of Praziquantel under certain conditions it is important to take into account the exclusion of light and elevated temperatures when planning future grinding experiments because light and temperature have been presumed theoretically and shown experimentally as the major catalysts in such oxidative degradation pathways.

The grinding is done in closed metal, hermetically sealed containers, so the treated samples are by default protected from light. Furthermore, it would be very important to provide some kind of temperature tracking and regulation during the mechanochemical experiments. Cryogenic conditions are probably necessary, but temperatures below room temperature should be considered. The second critical factor is the oxygen itself. In the pharmaceutical industry, many operations are done under the inert atmosphere of nitrogen, the experiments of mechanochemical activations should be redone in an inert atmosphere as well, this can be done by purging the vessels with either nitrogen or argon and then hermetically sealing them for the entire experiment. This kind of future planning of the experiments will give new insights into the mechanism of degradation and will make the development and scale-up of the process of mechanochemical activation possible.

SADRŽAJ

SAŽETAK.....	v
SUMMARY	vii
1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1. Povijesni razvoj i značaj prazikvantela	1
1.2. Metabolizam i farmakokinetika.....	2
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	5
3. MATERIJALI I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI	7
3.1. Mehanokemijska aktivacija mljevenjem	8
3.1.1. Mlinovi.....	9
3.2. Modifikacija bioraspoloživosti PZQ	10
3.2.1. Mehanokemijska aktivacija mljevenjem bez dodatka aditiva.....	10
3.2.2. Primjena mehanokemijske aktivacije mljevenjem u pripremi kokristala PZQ..	13
3.2.3. Priprema ciklodekstrinskih inkluzijskih kompleksa PZQ mehanokemijskom aktivacijom mljevenjem	15
3.2.4. Priprema polimernih disperzija PZQ s povidonom i kros-povidonom mehanokemijskom aktivacijom.....	20
3.2.5. Mljevenje PZQ s mezoporoznim silicijevim dioksidom.....	27
3.2.6. Mljevenje PZQ s površinski aktivnim tvarima	31
4. RASPRAVA.....	33
4.1. Teorijski putevi razgradnje PZQ	33
4.2. Usporedba mehanizama nastanka teorijski i literaturno opisanih razgradnih produkata PZQ	40
4.3. Teorijski putevi optimizacije kemijske stabilnosti PZQ tijekom mehanokemijske aktivacije	42
4.4. Mutageni potencijal identificiranih razgradnih produkata	43
5. ZAKLJUČAK	45
6. LITERATURA.....	47
ABECEDNI POPIS SKRAĆENICA	50
7. ŽIVOTOPIS	51

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Povijesni razvoj i značaj prazikvantela

Prazikvantel (2-cikloheksanokarbonil-1*H*,2*H*,3*H*,4*H*,6*H*,7*H*,11*bH*-pirazino[2,1-*a*]izokinolin-4-one, PZQ) je jedan od ključnih lijekova za liječenje parazitoza. Ima široku primjenu u veterini a kod ljudi se koristi za liječenje shistosomijaze (1), raširene tropske bolesti uzrokovane s pet različitih vrsta parazita shitostoma. Prenosioci ovih parazita su puževi koji se nalaze u izvorima svježe vode i endemska su vrsta u 74 zemlje. Shitostomijaza je skupni naziv za bolesti vezane uz zarazu ovim parazitima, od kojih su najčešće lezije urinarnog trakta i jetre, a kod djece dolazi do zastoja u rastu i razvoju.

PZQ je razvijen u suradnji odjela istraživanja i razvoja dvije velike farmaceutske kompanije (Mercka i Bayera). Istraživanje je počelo u Mercku na pirazino-izokinolinskoj skupini spojeva koji su se prvotno trebali koristiti kao lijekovi za smirenje (2). Dio spojeva iz ove skupine dogovorno je predan u Bayer na daljnje testiranje za veterinarske potrebe, te se pokazalo da su ovi spojevi vrlo učinkoviti antihelminetici (3).

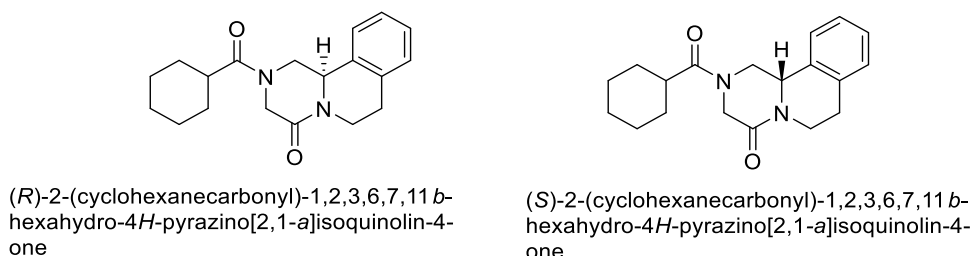
PZQ je tako prvo razvijen za veterinarsku primjenu, a tek kasnije je odobren i za humanu upotrebu. Spoj je patentiran u Njemačkoj 1973. godine, a u SAD 1977. godine (4,5). Bayer je u dogovoru sa svjetskom zdravstvenom organizacijom (WHO) obavio niz multicentričnih ispitivanja da dokaže učinkovitost i sigurnost primjene PZQ na ljudima.

PZQ je tijekom 1980-ih prepoznat kao prvi izbor pri liječenju shitostomijaze kod ljudi, zbog svoje učinkovitosti, niske toksičnosti te jednostavnosti primjene u obliku jednokratne, oralne doze (6). Korejska farmaceutska tvrtka Shin Poong također je prepoznala važnost ove djelatne tvari te je u suradnji s korejskom vladom razvila novi, jeftiniji proces sinteze za koji su dobili i patentnu zaštitu. Niža cijena lijeka omogućila je 1993. godine smanjenje stope zaraženosti shitostomama u Koreji s 41% (1981.g.) na 4% te je Shin Poong ubrzo prerastao u najvećeg proizvođača PZQ.

PZQ se nalazi na listi esencijalnih lijekova WHO-a (7). U današnje vrijeme koristi se unutar programa WHO-a za liječenje kao i profilaksu od zaraze *S. mansoni* and *S. haematobium* parazitima na području Afrike (8).

1.2. Metabolizam i farmakokinetika

Djelatna tvar PZQ je racemična smjesa dva enantiomera, (*R*)-PZQ i (*S*)-PZQ (slika 1) (9).



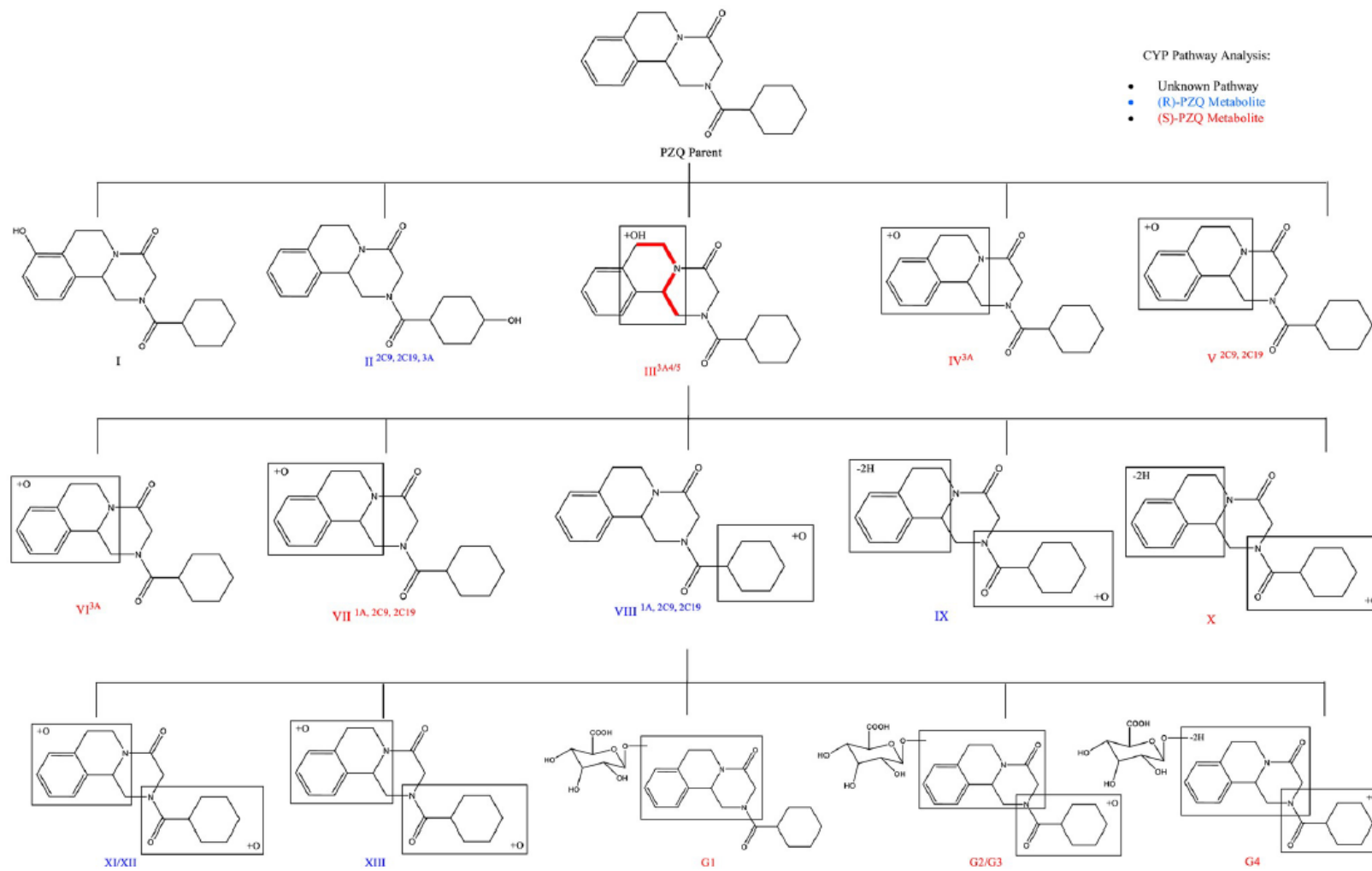
Slika 1. Enantiomeri PZQ

Samo *R*-PZQ pokazuje antishitosomatsku aktivnost, dok *S*-PZQ nema farmakološku aktivnost ali pridonosi određenom broju poznatih nuspojava te je odgovoran za gorak okus lijeka (10). Bez obzira na to što je samo *R*-PZQ biološki aktivan, djelatna tvar se zbog ekonomičnosti koristi kao smjesa enantiomera te se tako i formulira u lijek. Lijek za primjenu kod odraslih ljudi i djece je filmom obložena tableta koja sadrži 600 mg smjese enantiomera PZQ. Nakon apsorpcije otprilike 80% djelatne tvari vezano je na proteine plazme, a vrhunac koncentracije djelatne tvari u plazmi je nakon 1-3 h nakon primjene. Međutim, PZQ je poznat po varijabilnosti u terapijskoj učinkovitosti i bioraspoloživosti i ova tema je meta brojnih istraživanja. Poznato je da na oslobađanje djelatne tvari iz lijeka i njegovu apsorpciju utječe hrana (11), a da na razine djelatne tvari u plazmi utječu interakcije s drugim lijekovima (12). Uzimanje PZQ sa određenom hranom, posebno ugljikohidratima najvjerojatnije mijenja pH želučane kiseline i povećava raspadljivost tablete te time pridonosi oslobađanju slabo topljive djelatne tvari iz oblika. PZQ nije stabilan i intenzivno se metabolizira prilikom prvog prolaska kroz jetru te mu je vrijeme poluživota oko 1h, dok je vrijeme poluživota metabolita 4-5 h. Više od 99% metabolita se uspješno eliminira putem bubrega (13). Zbog tog značajnog metaboličkog raspada tijekom prvog prolaska kroz jetru i činjenice da je samo pola apsorbirane količine djelatne tvari (jedan enantiomer) biološki aktivan, koncentracije djelatne tvari u serumu/plazmi su relativno niske, a da bi se postigla minimalna učinkovita koncentracija od 250 ng/mL nužna je primjena relativno visoke doze lijeka. Farmakokinetičko djelovanje *R*-PZQ nije još u potpunosti razjašnjeno, ali pripisuje se pobudi nekontroliranih kontrakcija mišića nametnika preko disruptivnog djelovanja na metabolizam kalcija. Ovo najviše utječe na same hvataljke nametnika te se oni prisilno moraju otpustiti s mjesta na koja su se uhvatili. Ovakav mehanizam

utječe na odrasle parazite, međutim ne djeluje na ličinke (13). Brojne studije napravljene su na ispitivanju farmakokinetičkih svojstava PZQ te njegovih metabolita i njihove aktivnosti zbog dokazane varijabilnost u učinkovitosti liječenja. U jednom preglednom radu pobrojano je 17 metabolita oba enantiomera (slika 2) jer PZQ podliježe znatnoj metaboličkoj razgradnji tijekom prvog prolaza kroz jetru.

Utvrđeno je dakle da niz čimbenika može dovesti do smanjene učinkovitosti samog lijeka. Kao iznimno važan čimbenik istaknula se formulacija lijeka te prisutnost drugog enantiomera, zdravlje jetre pacijenta, starost, korištenje drugih lijekova itd.

Niska i varijabilna oralna bioraspoloživost te nepostojanje farmaceutskog oblika lijeka prikladnog za primjenu u pedijatrijskoj populaciji glavni su problemi povezani s primjenom ovog esencijalnog lijeka. Lijek se primjenjuje u dozi od 40-60 mg/kg, što u praksi znači da se djeci tjelesne mase 5-7 kg daje $\frac{1}{4}$ tablete (150 mg PZQ), 8-10 kg $\frac{3}{4}$ tablete (450 mg PZQ), 11-15 kg 1 tableta (600 mg PZQ), 16-21 kg 1 $\frac{1}{2}$ tableta (900 mg PZQ) te 2 tablete (1200 mg PZQ) za djecu od 22-25 kg. (14) No, lomljenjem tablete oštećuje se zaštitna ovojnica čija je uloga maskiranje neugodnog okusa lijeka, pa suradljivost pedijatrijskih bolesnika smanjuje. Također, ovdje je riječ o djeci uzrasta od 3-72 mjeseca starosti, kod kojih je primjena čvrstih oralnih oblika neprikladna. Zbog toga su u fokusu brojnih istraživanja razvoj tekućih oblika s fleksibilnim doziranjem lijeka, koji bi bili prikladni za primjenu u pedijatriji. (45) Osim toga, brojna istraživanja bave se raznim aspektima poboljšanja bioraspoloživosti PZQ u organizmu, a obzirom da se lošija oralna bioraspoloživost može donekle povezivati i s niskom topljivosti samog PZQ u vodi, koji se prema biofarmaceutskoj klasifikaciji lijekova klasificira u II (BCS-II) skupinu lijekova jedan od načina kako se može prevladati ova zapreka je i povećanju topljivosti lijeka.



Slika 2. Preuzeto iz *PLoS Negl Trop Dis* 14(9): e0008649 uz suglasnost izdavača (9).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Prazikvantel (PZQ) je lijek izbora za shistosomijazu, zanemarenu, ali široko rasprostranjenu tropsku bolest koju uzrokuju paraziti *Shistoma* vrste. Procjenjuje se da bolest pogađa 2064 milijuna ljudi diljem svijeta. Obično se dozira kao jedna, oralna doza od 20-40 mg/kg. Zbog svoje učinkovitosti i jeftine proizvodnje, WHO ga je uvrstila na listu esencijalnih lijekova za liječenje djece i odraslih. Djelatna tvar je racemat, pri čemu je samo *R*-PZQ terapijski aktivan, dok je *S*-PZQ neaktivan te doprinosi gorkom okusu i nuspojavama lijeka. Primjena u obliku racemične smjese doprinosi većoj koncentraciji terapijski aktivnog oblika u organizmu. Glavni problem s primjenom PZQ je u niskoj i varijabilnoj oralnoj bioraspoloživosti te nedostupnosti farmaceutskog oblika lijeka prikladnog za primjenu u pedijatrijskoj populaciji, naročito za djecu mlađu od 6 godina. Lošija oralna bioraspoloživost je donekle poveziva s niskom topljivosti samog PZQa u vodi, koji se prema biofarmaceutskoj klasifikaciji lijekova klasificira u II. skupinu lijekova.

Mehanokemijska aktivacija mljevenjem uz odgovarajuće aditive je jedan od inovativnih pristupa koji se primjenjuju za poboljšanje fizikalno-kemijskih i biofarmaceutskih svojstva PZQ. Postupak je moguće provesti u suhom stanju (engl. *neat grinding*, NG) ili uz dodatak minimalne količine otapala (engl. *liquid assisted grinding*, LAG). Na ovaj način moguće je prirediti široki spektar produkata, što je pokazano u brojnim publikacijama(25-33,35). Tako su uspješno pripremljene polimerne disperzije s povidonom i kros-povidonom, novi polimorfni oblici lijeka, ciklodekstrinski inkluzijski kompleksi te kokristali s različitim organskim kiselinama. No, s obzirom da je mehanokemijska aktivacija mljevenjem u vibracijskim mlinovima visokoenergetski proces, posebnu pažnju je potrebno posvetiti kemijskoj stabilnosti lijeka tijekom procesa mljevenja.

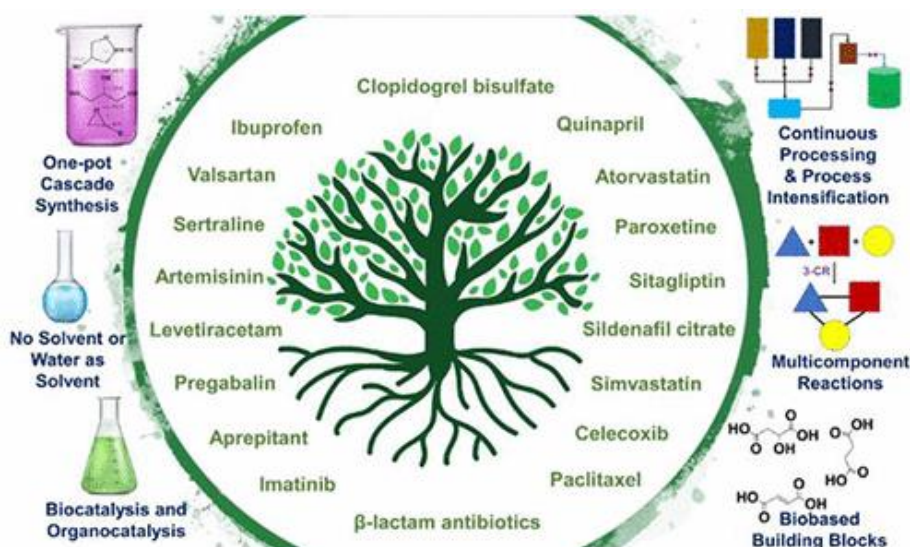
Cilj predloženog istraživanja je na temelju dostupnih literaturnih podataka razmotriti prednosti i nedostatke mehanokemijske aktivacije PZQ mljevenjem. Biti će prikazani svi pripremljeni produkti PZQ od kojih neki pokazuju veću topljivost te su po svojim karakteristikama prikladni za razvoj suvremenih ljekovitih oblika i terapijskih sustava tog lijeka. Hipoteza je da PZQ ima smanjenu kemijsku stabilnost tijekom procesa mljevenja te će se iz dostupnih podataka pobrojati i istražiti mogući razgradni putevi i produkti i mehanizmi njihova nastanka. Aditivi korišteni u procesu mljevenja, kao i korišteni procesni parametri mogu doprinijeti razgradnji PZQ. Strukture razgradnih produkata usporedit će se s poznatim

metabolitima, a mehanizmi nastanka razgradnih produkata bit će razmotreni i uspoređeni s nekim teorijski mogućim generiranim primjenom programa *Lhasa Zeneth* (15).

Razmatrani mehanizmi nastanka razgradnih produkata dat će uvid u kritične točke mehanokemijske aktivacije koje je moguće modificirati u budućim istraživanjima s ciljem očuvanja kemijske stabilnosti lijeka, a olakšat će se i selekcija aditiva u budućim procesima mljevenja. Također će se procijeniti potencijal primjene mehanokemijske aktivacije u suvremenoj farmaceutici. Ova saznanja mogu biti od velike važnosti u razvoju suvremenih formulacija s kontroliranim i ciljanim oslobađanjem lijekova niske topljivosti te tako omogućiti uspješniju terapiju kao i proširenje terapijskih indikacija lijekova.

3. MATERIJALI I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI

Farmaceutska industrija spada u velike svjetske zagađivače vode, zraka i tla te značajno pridonosi ubrzanju efekata globalnog zatopljenja (16). Obzirom da se industrija sinteze djelatnih tvari i pomoćnih tvari dominantno oslanja na organsku sintezu, negativni učinci na okoliš nisu neočekivani niti zanemarivi. Organska sintetska kemija se tijekom druge polovine 20. stoljeća značajno pokušava okrenuti učinkovitijim procesima te su na tim načelima razvijeni principi „zelene kemije“ (slika 3.).



Slika 3. Preuzeto iz *Chem. Rev.* 2022, 122, 3, 3637–3710 (16) uz suglasnost izdavača.

Na slici 3 prikazani su neki od trenutno razvijanih segmenata na polju zelene kemije, a koji su implementirani u procese sinteze i proizvodnje djelatnih tvari i lijekova. Jedan od značajnijih pomaka u razvoju zelene kemije svakako je smanjivanje silnih količina otapala koja se koriste u procesima sinteze. Uporaba organskih otapala svodi se na minimalne količine, a gdje je moguće pokušavaju se maksimalno zamijeniti vodom ili nekim drugim prihvatljivijim otapalom, koje neće biti štetno za okoliš (17). Pristup reakcijama, kao uzastopnom slijedu po dva reaktanta, koji će dati produkt kao ulaz u sljedeći korak zamjenjuju se multikomponentnim reakcijama (MCR) i „one-pot“ slijednim reakcijama, a biokataliza prikladnim enzimima sve više zamjenjuje organsku katalizu koja koristi skupe i toksične komplekse sa metalnim katalizatorima.

Mehanokemija kao kemija koja se provodi u krutom stanju, bez upotrebe otapala ili sa upotrebom katalitičkih količina otapala, svakako spada u smjer u kojem ide razvoj procesa unutar „zelene kemije“ i u farmaceutskoj industriji.

3.1. Mehanokemijska aktivacija mljevenjem

Mehanokemija je grana kemije u kojoj se kemijske reakcije provode dovođenjem mehaničke, a ne termičke energije, što je uobičajeni klasičan način dovođenja energije. Proces se provodi u mlinovima različite izvedbe, a uključuje mljevenje samog lijeka ili mljevenje lijeka uz odgovarajuće aditive (18).

Prednost mehanokemijske sinteze u farmaceutskoj industriji je u mogućnosti provođenja kemijske sinteze u čvrstom stanju, čime se isključuje uporaba organskih otapala, čije je uklanjanje iz konačnog produkta komplicirano, a može rezultirati i toksičnim učincima. Daljnja je prednost da mehanokemija omogućuje jednostavno modificiranje fizikalno-kemijskih svojstava djelatnih tvari u svrhu povećanja bioraspoloživosti, u prvom redu uslijed povećanja topljivosti produkata pripremljenih mehanokemijskom sintezom.

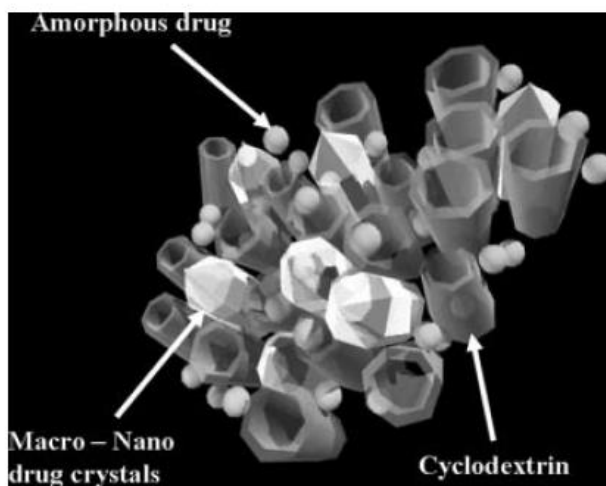
U jednokomponentnom sustavu mehanokemijska aktivacija mljevenjem prevodi tretirani materijal u metastabilnu zonu, gdje on, da bi se vratio u osnovno energetska stanje, otpušta višak energije u vidu topline ili dolazi do smanjenja veličine čestica. Vremena relaksacije su vrlo brza (10^1 - 10^{-7} s). Kao produkti nastaju nanokristalne čestice, novi polimorfni oblici ili amorfni materijal, koji je fizički nestabilan te kao takav nije prikladan za primjenu u farmaceutici.

Fizička nestabilnost produkta može se modificirati dodatkom određenih komponenti (stabilizatora) u smjesu prije mljevenja koje će se s djelatnom tvari povezati slabim vezama (Van de Waalove veze, vodikove veze, itd.) i na taj način dugoročno stabilizirati mehanokemijski aktivirane oblike djelatne tvari (19). Ovakvi višekomponentni sustavi su kompleksniji, jer se u njima mehanička energija prenosi i na djelatnu tvar i na dodane aditive odnosno pomoćne tvari.

Vrlo zanimljiv primjer je dodatak ciklodekstrina, cikličkih oligosaharida, gdje dolazi do ugradnje amornog materijala ili nanokristala djelatne tvari u međuprostore ciklodekstrinske strukture (slika 4). Do stabilizacije dolazi zbog fizikalnih interakcija između djelatne tvari i površine ciklodekstrina, a u kontaktu s vodom dolazi do ciklodekstrinima posredovanog

otapanja djelatne tvari i nastajanja inkluzijskih kompleksa, čime se može značajno unaprijediti topljivost teško topljivih lijekova.

Tehnike koje se koriste za potvrdu nastanka ovakvih kompleksa i njihovu analizu su difrakcija rendgenskih zraka (XRPD, eng. *X-Ray Powder Diffraction*), IR i Raman spektroskopija, NMR spektroskopija, diferencijalna kalorimetrija (DSC, eng. *Differential Scanning Calorimetry*), termalna gravimetrija (TGA) te optička mikroskopija.



Slika 4. Struktura ciklodekstrinskih kompleksa lijeka pripremljenih mehanokemijskom aktivacijom mljevenjem (Preuzeto iz Boldyrev 2004 (19) uz suglasnost izdavača).

3.1.1. Mlinovi

Mlinovi u procesnoj industriji se dijele u različite kategorije, zavisno o mehanizmu koji dovodi do usitnjavanja tretirane sirovine. U mehanokemijskoj sintezi najznačajniji su kuglični mlinovi. U kugličnom mlinu mehanička energija se prenosi na tretiranu tvar preko tijela mlina i/ili kuglica koje su radni elementi mlina. Usitnjavanje i mehanička aktivacija sirovine događa se uslijed udara i smicanja do kojih dolazi tijekom međusobnih sudara kuglica te sudara kuglica i stjenki mlina. S obzirom na način izvedbe kugličnih mlinova te prijenos mehaničke energije razlikujemo rotacijski, planetarni i vibracijski kuglični mlin. Visoko energijski vibracijski kuglični mlinovi su najznačajnija vrsta koja se koristi za mehanokemijsku aktivaciju.

3.2. Modifikacija bioraspoloživosti PZQ

Varijabilna oralna bioraspoloživost PZQ povezuje se s njegovom niskom topljivosti u vodi te intenzivnom metaboličkom razgradnjom tijekom prvog prolaska kroz jetru (20). S obzirom da se PZQ ubraja u II. skupinu prema BCS klasifikaciji (eng. *Biopharmaceutical Classification System*), povećanjem topljivosti, primjenom odgovarajućih tehnoloških mjera, moguće je povećati oralnu bioraspoloživost. U tu svrhu istražuje se prikladnost različitih principa. Najranija istraživanja na povećanju topljivosti ovog lijeka uključuju klasične pristupe tj. pripremu čvrstih disperzija (21) (SD, eng. *Solid Dispersions*) s polimerima te ciklodekstrinskih inkluzijskih kompleksa (22).

Posljednjih desetljeća velik dio istraživanja u području farmaceutske tehnologije usmjeren je na razvoj novih strategija za poboljšanje bioraspoloživosti oralno primijenjenih lijekova. U tom smislu, mehanokemija je relativno nova tehnika i u posljednja 3 desetljeća raste interes za njenu primjenu. Nekoliko neovisnih studija pokazalo da je tehnika učinkovita i često bolja od drugih pristupa tijekom probira novih čvrstih oblika lijeka (23). Kao posljedica eksperimentalne jednostavnosti metode (u usporedbi s tradicionalnijim protokolima, npr. metodama temeljenim na otapalu), visoke učinkovitosti i raspona uvjeta dostupnih u mehanokemijskom probiru, ovu tehnologiju ne treba smatrati samo alternativnom metodom kada se drugi pristupi nisu pokazali učinkovitim već ona ima mnogo veće značenje. Mehanokemija se nameće kao ključna strategija u razvoju novih čvrstih oblika lijekova s niskom oralnom bioraspoloživosti jer omogućuje relativno jednostavnu pripravu produkata širokog spektra čvrstih oblika lijekova u kratkom vremenu, zahtijevajući male količine materijala te je prikladna i za rane faze razvoja novog lijeka (24). Ova metodologija je uspješno primijenjena u razvoju novih čvrstih oblika PZQ.

3.2.1. Mehanokemijska aktivacija mljevenjem bez dodatka aditiva

Najstabilniji polimorfni oblik PZQ racemata je bezvodna forma A. Mljevenjem bez dodatka otapala (NG) dobivena je i bezvodna forma B (25). Identifikacija kristalne forme provedena je DSC, TG, SEM analizom u kombinaciji s NMR spektroskopijom u čvrstom stanju (eng. *solid state NMR*) i ATR-FTIR analizom. Kristalna struktura riješena je na temelju XRPD analize. Nova forma B također je okarakterizirana na temelju svojih biofarmaceutskih svojstava.

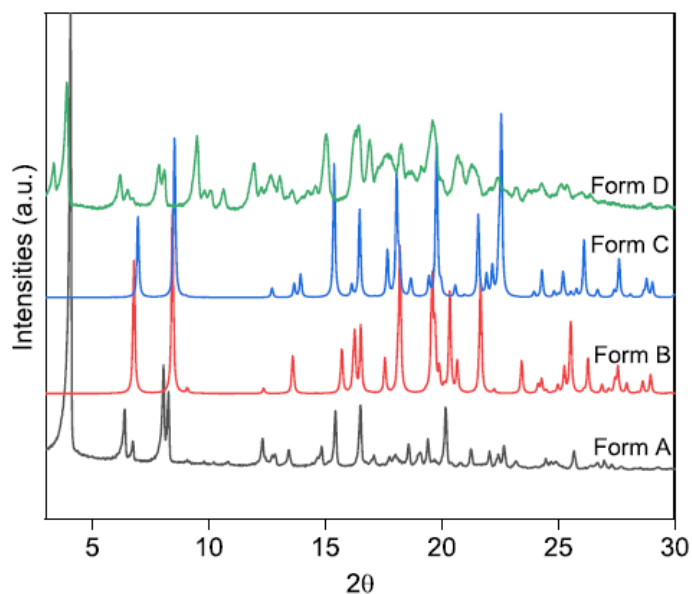
Ispitana je topljivost PZQ, i intrinzično oslobađanje (tablica 1). HPLC analiza korištena je za otkrivanje razgradnih produkata prisutnih u novom polimorfnom obliku te je pokazano da je udio razgradnih produkata svega 0,42%, bez obzira na dugotrajno mljevenje (4 h) koje je potrebno za pripremu novog oblika. Obzirom na malu količinu transformacijskih produkata nisu rađene dodatne analize u svrhu njihove identifikacije.

Tablica 1. Topljivost i intrinzična brzina oslobađanja polimorfnih oblika A i B PZQ u vodi (preuzeto iz Zanolla i suradnici (25) uz suglasnost izdavača).

Topljivost (C_s) i intrinzično oslobađanje djelatne tvari u vodi (srednja vrijednost \pm S.D., $n=3$)		
uzorak	C_s (20 ⁰ C; mg/L)	IDR (37 ⁰ C; $\mu\text{g cm}^{-2} \text{min}^{-1}$)
PZQ	140,30 \pm 9,26	31,2 \pm 0,6
Forma B	281,31 \pm 8,32	62,2 \pm 1,3

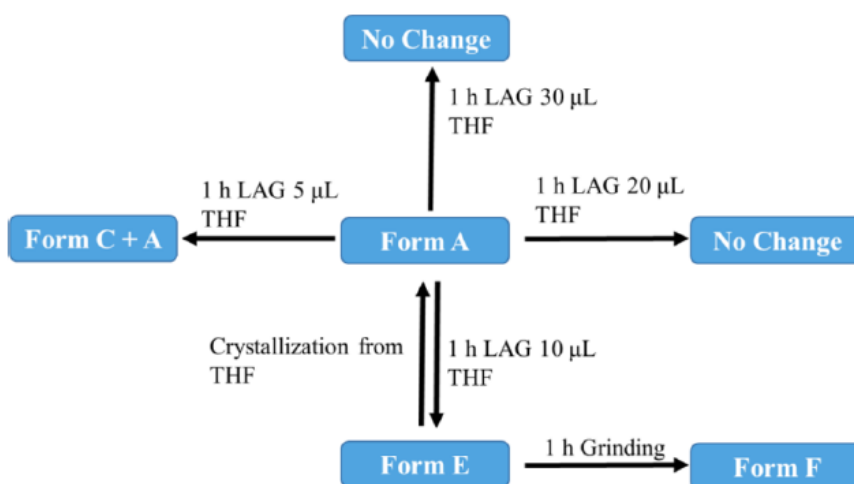
Forma B ima dvostruko veću topljivost u vodi i IDR. Ispitana je i *in vitro* aktivnost na *S. mansoni* nematodama, a vrijednost IC_{50} pokazala se sličnom ($IC_{50, \text{formaB}} = 0,135 \mu\text{g/mL}$, $IC_{50, \text{PZQ}} = 0,165 \mu\text{g/mL}$). Napravljena je i pilotna studija na 4 zaražena miša (*in vivo*), jednokratnom oralnom primjenom doze od 400 mg. Nakon 90 dana došlo je do 100% smanjenja zaraze u slučaju forme B i do 98% u slučaju PZQ. Rađene su i stabilitetne studije, gdje se pokazalo da je forma B stabilna najmanje 12 mjeseci, ako se čuva uz uvjete niske vlažnosti. Tijekom daljnjih detaljnih studija u svrhu optimizacije sinteze forme B, suhim mljevenjem, isti autori otkrili su dodatnu formu, formu C (26).

Forma C također je bezvodna forma PZQ, moguće ju je dobiti samo suhim mljevenjem PZQ, dok je konvencionalnim tehnikama kristalizacije nemoguće do nje doći, topljivost joj je veća od forme B (329 mg/L), međutim nije stabilna i u roku od 2 mjeseca, stajanjem, rekristalizira u formu A. U drugačijim uvjetima suhog mljevenja još je dobivena i četvrta bezvodna forma, forma D (26). Na slici 5 je usporedni prikaz XRPD spektara forme A, B, C i D.



Slika 5. Usporedni prikaz XRPD spektara polimorfnih oblika A, B, C i D PZQ (Preuzeto iz Saikia i suradnici (27) uz suglasnost izdavača).

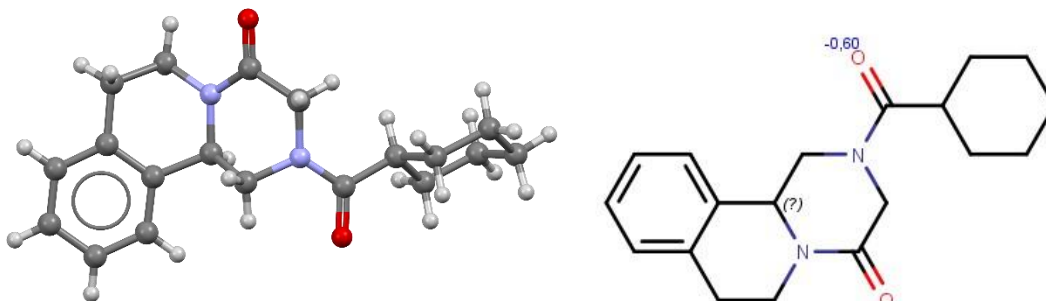
Da bi dodatno istražili prijelaz djelatne tvari iz jedne polimorfne forme u drugu, tijekom mehanokemijske aktivacije mljevenjem, Saikia i suradnici proveli su i mljevenje uz dodatke različitih količina otapala, VALAG (*Variable Amount Liquid Assisted Grinding*). Kao otapalo korištene su male količine (5-30 μ L) tetrahidrofurana (THF), a shematski prikaz provedenih protokola mljevenja i ishodnih produkata prikazan je na slici 6. U ovom procesu otkriven je novi polimorfni oblik, forma E koja produljenim mljevenjem daje amorfni oblik F (slika 6).



Slika 6. Rezultati dobiveni mljevenjem PZQ koju su proveli Saikia i suradnici (27) (Preuzeto uz suglasnost izdavača).

3.2.2. Primjena mehanokemijske aktivacije mljevenjem u pripremi kokristala PZQ

PZQ, obzirom na svoju strukturu (slika 7), ne stvara soli s kiselinama te uobičajena kemijska opcija povećanja topljivosti prevođenjem baze u neku od topljivih soli nije primjenjiva.



Slika 7. Kemijska struktura PZQ (izrađeno primjenom Marvin Sketch programskog alata)

Priprema kokristala jedan je od modernijih principa koji se intenzivno primjenjuju u poboljšavanju topljivosti i oralne bioraspoloživosti lijekova. Stvaranjem kokristala ne dolazi do prijelaza elektrona s molekule lijeka na koformer, već on stupa u interakciju s prikladnim koformerom slabim kemijskim vezama. Najčešći supramolekularni sintoni koji se koriste u farmaceutskim kokristalima su $-C=O \cdot \cdot HO-$, $-C=O \cdot \cdot H-$ i $-C=O \cdot \cdot H-N$ vodikove veze, do kojih dolazi interakcijom funkcionalnih skupina lijeka sa spojevima poput alkohola, karboksilnih kiselina, ugljikohidrata, aminokiselina i amida (28).

Kokristali PZQ i različitih organskih kiselina već su ranije opisani u literaturi. Pripremljeni su klasičnim kristalizacijskim metodama iz otopina, međutim njihov farmaceutski potencijal nije dalje istraživan (29, 30).

Primjenom mehanokemijske aktivacije mljevenjem pripremljeni su kokristali PZQ s limunskom, jabučnom, salicilnom i vinskom kiselinom (31) te fenolnim kiselinama (32). Korištene su tehnike suhog mljevenja (NG) i mljevenja uz katalitičke količine otapala (LAG), uz ekvimolarni omjer lijeka i ispitivanih kiselina. LAG tijekom 30 minuta i 25 Hz s dodatkom katalitičke količine etanola rezultirao je polikristalnim produktima, dok se NG nije pokazao uspješnih. Pripremljeni kokristali pokazuju pH ovisnu topljivost (tablica 2) obzirom da upotrijebljene kiseline sadrže ionizabilne skupine u svojoj strukturi, a najveću topljivost pokazuju u mediju pH vrijednosti 6.8.

Tablica 2. Sastav i fizikalno-kemijska karakterizacija kokristala koje su u svom istraživanju priredili Cugovčan i suradnici (31) (preuzeto i prilagođeno uz suglasnost izdavača)

uzorak	aditiv	PZQ/ aditiv	Metoda pripreme	T _{onset} (PZQ) °C	ΔH _{fuz} (PZQ) Jg ⁻¹	RDC/ %	s ₀ /mg mL ⁻¹		
							pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8
PZQ	-	-	-	142,28	92,33	100,00	0,219		
PZQ GR	-	-	NG	136,34	74,33	80,94	0,220		
PZQ/CA	citratna kiselina	1:1 (molarni udio)	LAG	-	-	nova forma	0,296	0,325	0,300
PZQ/MA	jabučna kiselina			-	-		0,390	0,464	0,405
PZQ/SA	salicilatna kiselina			-	-		0,142	0,375	0,337
PZQ/TA	tartaratna kiselina			-	-		0,307	0,346	0,316

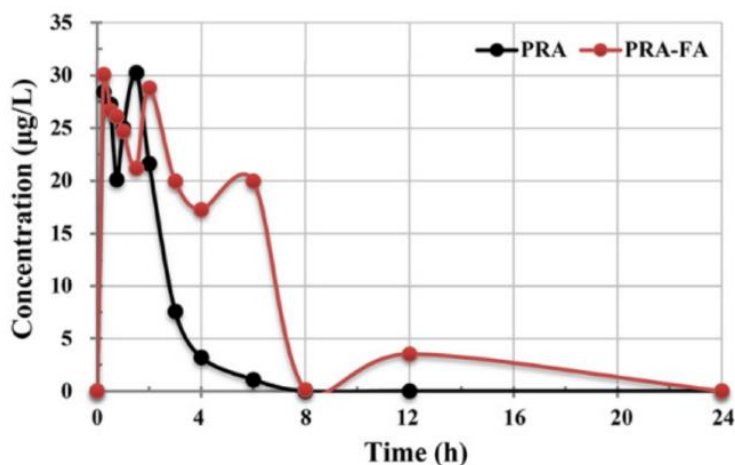
Najizraženije povećanje topljivosti uočeno je kod kokristala s jabučnom kiselinom, za koju su provedena istraživanja *in vitro* otapanja u simuliranom želučanom (pH 1,2) i crijevnom mediju (pH 6,8). Kao pokazatelji brzine i opsega oslobađanja korišteni parametri količine otopljenog lijeka nakon 15 minuta (Q_{15min}) te učinkovitost oslobađanja nakon 60 minuta (DE_{60min}) (tablica 3) te je uočeno značajno povećanje brzine i opsega otapanja kod kokristala.

Tablica 3. Postotak oslobođene djelatne tvari nakon 15 min (Q_{15min}) i učinkovitost oslobađanja nakon 60 minuta (DE_{60min}) za PZQ i kokristal s jabučnom kiselinom te binarne i ternarne komplekse PZQ s ciklodekstrinima (preuzeto iz Cugovčan i suradnici (31) uz suglasnost izdavača).

uzorak	pH 1,2		pH 6,8	
	Q _{15min} /%	DE _{60min} /%	Q _{15min} /%	DE _{60min} /%
PZQ	9,89±0,71	15,49±2,47	9,86±0,58	15,62±2,39
PZQ/MA	24,63±3,06	29,35±4,10	37,65±3,02	42,42±3,13
PZQ/HPβCD	95,09±2,23	92,18±1,09	97,78±1,88	93,22±0,74
PZQ/MEβCD	93,52±0,39	92,48±0,45	95,15±0,45	91,11±0,11
PZQ/SBEβCD	51,80±3,61	56,93±3,11	67,00±1,52	68,97±1,67
PZQ/HPβCD/MA	94,61±1,91	92,97±1,77	95,57±2,89	95,11±0,55
PZQ/MEβCD/MA	96,44±1,45	90,26±1,59	98,81±1,33	92,16±1,35

Kokristali PZQ s fenolnim kiselinama (32) pripremljeni su primjenom LAG, a korištene su katehuinska kiselina (PA), galna kiselina (GA) i ferulinska kiselina (FA). Provedena je detaljna fizikalno-kemijska i strukturna karakterizacija produkata. Kokristali s ferulinskom kiselinom pokazuju najizraženije povećanje topljivosti pa je ispitana i bioraspodivnost *in vivo* na modelu štakora (31). Ovisnost koncentracije lijeka u plazmi štakora u ovisnosti o vremenu, usporedno za PZQ i kokristal s ferulinskom kiselinom prikazana je na slici 8. U usporedbi s PZQ, oralna primjena kokristala rezultira većom bioraspodivnosti ($AUC_{(0-24 h)}$) i bržim postizanjem maksimalne plazmatske koncentracije (T_{max}), što je u pozitivnoj korelaciji s

povećanom topljivosti i brzinom otapanja opaženom *in vitro*. Međutim, srednje vrijeme zadržavanja ($MRT_{(0-\infty)}$), maksimalna plazmatska koncentracija (C_{max}) i vrijeme polueliminacije ($t_{1/2}$) su istovjetni za oba ispitana produkta. Točne vrijednosti farmakokinetičkih podataka za oralnu primjenu PZQ i kokristala s ferulinskom kiselinom autori u publikaciji nisu odredili.



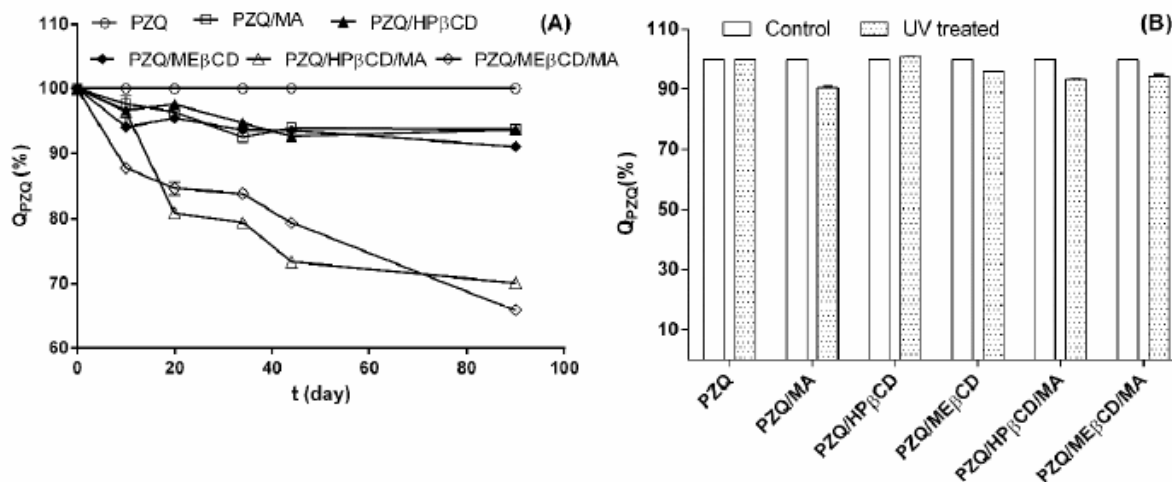
Slika 8. Ovisnost koncentracije PZQ u plazmi o vremenu nakon oralne primjene PZQ i kokristala s ferulinskom kiselinom štakorima u dozi od 100 mg/kg (preuzeto iz Yang i suradnici (32) uz suglasnost izdavača).

3.2.3. Priprema ciklodekstrinskih inkluzijskih kompleksa PZQ mehanokemijskom aktivacijom mljevenjem

Ranija istraživanja pokazuju da pripremom inkluzijskih kompleksa lijekova s ciklodekstrinima (CD) može, između ostalog, povećati brzinu oslobađanja lijeka *in vitro* i *in vivo* te u nekim slučajevima maskirati neugodan okus lijeka (33, 34), što je poželjno kod PZQ. Oralna primjena PZQ je naročito problematična kod djece, s obzirom na neugodan i intenzivno gorak okus lijeka. U tom smislu, 2010. godine pripremljeni su inkluzijski kompleksi PZQ s β CD metodom liofilizacije (35). Ovi kompleksi pokazali su povećanje antihelmintičko djelovanje kod miševa zaraženih *Schistosoma mansoni* nametnicima.

U istraživanjima Cugovčan i suradnika korištena je mehanokemijska aktivacija mljevenjem u vibracijskim mlinovima i pripremljeni su binarni i ternarni inkluzijski kompleksi PZQ s CD te su ispitana njihova farmaceutsko-tehnološka i biofarmaceutska svojstva. Od niza pripremljenih produkata najveće povećanje topljivosti i *in vitro* brzine otapanja pokazali su binarni kompleksi PZQ s HP β CD (hidroksipropil- β -ciklodekstrin) i ME β CD (metilirani- β -ciklodekstrin) te ternarni kompleksi PZQ, jabučne kiseline i ovih CD (tablica 3).

Za te produkte provedeni su testovi stabilnosti pri ubrzanim uvjetima ($40\pm 2\text{ }^\circ\text{C}/75\pm 5\%$ RH) i ispitivanje fotokemijske stabilnosti koji su pokazali različiti stupanj razgradnje u binarnim i ternarnim produktima, dok se čisti PZQ pokazao stabilnim pod istim uvjetima (slika 9).



Slika 9. Stabilnost pri ubrzanim uvjetima raspada (A) i fotokemijska stabilnost (B) binarnih i ternarnih kompleksa PZQ (preuzeto iz Cugovčan i suradnici (31) uz suglasnost izdavača).

Utvrđeno je da raspad analiziranih uzoraka PZQ na ubrzanim uvjetima prati pseudo-kinetiku prvog reda, s $r^2 = 0,918-0,986$, a fotodegradacija lijeka u kompleksima je također značajna (slika 9B). Ovakvi rezultati za inkluzijske komplekse s CD nisu očekivani, obzirom da se CD često koriste i za kemijsku i fotokemijsku stabilizaciju djelatnih tvari (33). Smatra se da CD djeluju na način da štite molekulu koja je uklopljena u centralnu šupljinu od razgradnje. Međutim, to ovisi o dijelu molekule koji je uklopljen u centralnu šupljinu molekule CD. Ako je cijela molekula ili reaktivni dio molekule ugrađen, bit će i zaštićen te će razgradnja izostati. Međutim ako se reaktivni dio molekule nalazi izvan centralne šupljine CD, tada neće biti zaštićen, a CD mogu i katalizirati reakciju razgradnje, prijenosom elektrona na -OH skupine glukopiranoznih jedinica. Značajan je i učinak interakcije reaktivnih funkcijskih skupina djelatne tvari sa supstituentima na CD jezgri, što dovodi do daljnje destabilizacije molekule i katalizira sam raspad i degradaciju.

Rendgenskom analizom monokristala je pokazano da PZQ stvara inkluzijske komplekse na način da se aromatski dio izokinolinskog prstena uklapa u centralnu šupljinu (36). Dostupni podaci o termičkim i fotokemijskim putovima razgradnje PZQ-a pokazuju da je u tu reakciju uključen dio molekule (37, 38) koji nije zaštićen kompleksacijom s CD.

Nadalje, binarni kompleks s HPβCD pokazuje prihvatljivi stupanj razgradnje, dok je razgradnja kod kompleksa s MEβCD značajna (slika 8). Ove razlike u stabilnosti mogu se

pripisati većem afinitetu aktivirane molekule lijeka za interakciju s lipofilnom metilnom skupinom, što rezultira izraženijim katalitičkim učinkom ME β CD na razgradnju PZQ.

Uvođenjem jabučne kiseline i pripremom ternarnih smjesa dolazi do značajne destabilizacije sustava i opsežne razgradnje PZQ te takvi produkti nisu prikladni za farmaceutsku primjenu.

U svrhu objašnjenja mehanizama destabilizacije PZQ utjecajem CD, isti autori proširili su studije na dodatne ciklodekstrine, uključujući β CD, HP β CD, SBE β CD (natrijev sulfobutyleter- β -ciklodekstrin) te su primjenom NMR spektroskopije i *docking* studijama ispitivali mehanizme inkluzije (39). Kompleksi su pripremljeni mehanokemijskom aktivacijom u omjerima 1:1 i 1:4 (PZQ/CD) te analizirani NMR spektroskopijom, a solubilizacijskim ispitivanjima su određene stabilnosti nastalih kompleksa ($K_{1:1}$, tablica 5).

Tablica 5. Konstante stabilnosti ($K_{1:1}$), efikasnost kompleksiranja (*CE*, eng. *Complexation Efficiency*) i povećanje topljivosti (S_{\max}/S_0) za binarne komplekse PZQ s CD, dobivene različitim analitičkim metodama (preuzeto iz Špehar i suradnici (39) uz suglasnost izdavača).

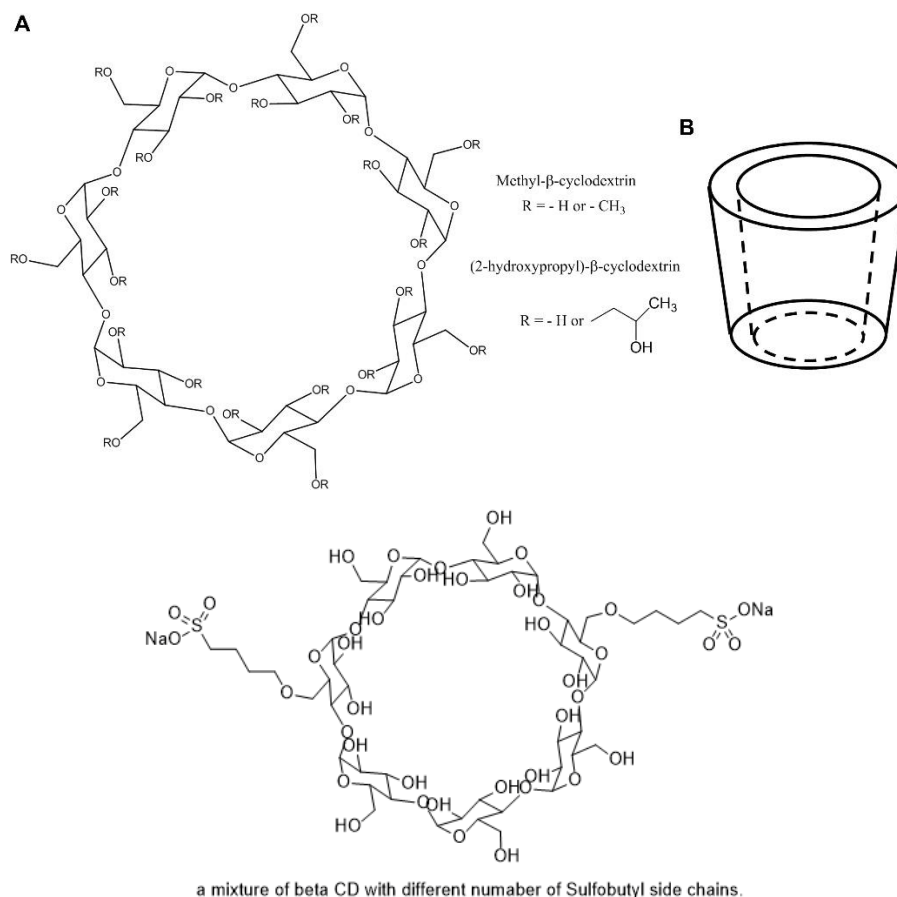
		β -CD	HP β CD	RM β CD	SBE β CD
$K_{1:1}/M^{-1}$	HPLC	456,77 \pm 19,68	282,18 \pm 5,90	543,02 \pm 1,70	487,55 \pm 34,61
	UV-Vis	422,63 \pm 87,49	230,08 \pm 43,05	483,64 \pm 67,88	378,70 \pm 47,40
	fluorescencija	441,67 \pm 15,86	281,30 \pm 16,60	517,24 \pm 45,07	517,68 \pm 55,06
CE	HPLC	0,33 \pm 0,03	0,21 \pm 0,01	0,37 \pm 0,01	0,34 \pm 0,01
	UV-Vis	0,33 \pm 0,05	0,21 \pm 0,01	0,34 \pm 0,04	0,33 \pm 0,03
	fluorescencija	0,33 \pm 0,03	0,23 \pm 0,01	0,39 \pm 0,01	0,35 \pm 0,03
S_{\max}/S_0	HPLC	5,26	10,63	16,58	15,44
	UV-Vis	4,73	8,44	15,17	12,19
	fluorescencija	5,09	9,51	15,79	16,37

Iz tablice 5 se može iščitati da stvaranje inkluzijskih kompleksa PZQ s RM β CD i SBE β CD rezultira najizraženijim povećanje topljivosti. Vrijednost konstanti stabilnosti pokazuje da su interakcije između PZQ i CD dovoljno jake da se kompleksi smatraju stabilnima, a opet dovoljno slabe da ne ograničavaju oslobađanje lijeka te njegovu apsorpciju u organizmu (40).

Analizom naprednim 2D NMR tehnikama pokazano je kako uz aromatski dio koji se ugrađuje u centralnu šupljinu molekule CD, i cikloheksanski i pirazinski prsten također sudjeluju u interakciji s CD.

Svi pripremljeni kompleksi podvrgnuti su uvjetima ubrzane razgradnje gdje je uočena razgradnja do 38% kod PZQ kompleksa s HP β CD. Proizlazi da se razina degradacije može povezati s konstantom stabilnosti kompleksa. Što je niža vrijednost konstante stabilnosti

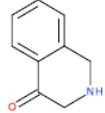
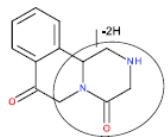
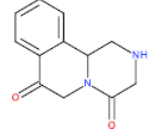
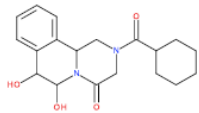
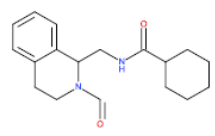
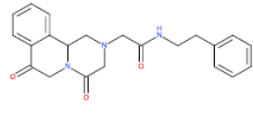
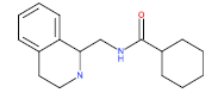
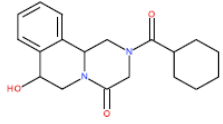
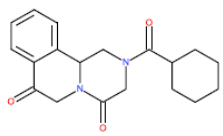
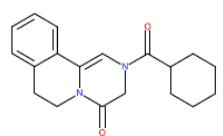
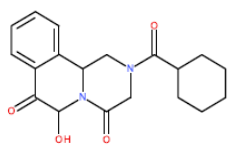
kompleksa, dolazi do značajnije razgradnje PZQ pri ispitivanim uvjetima. Jahro *et al.* (41) su pokazali na kompleksima CD sa spironolaktonom da kritičnu ulogu u kataliziranoj razgradnji lijeka imaju hidroksilne skupine na CD (slika 10). U inkluzijskim kompleksima s PZQ isto se pokazalo točnim, jer je najveća degradacija uočena s HP β CD ciklodekstrinom, dok su kompleksi a RM β CD i SBE β CD bili kemijski stabilniji, obzirom na reducirani broj slobodnih OH skupina.



Slika 10. Struktura ciklodekstrina korištenih u pripremi inkluzijskih kompleksa PZQ primjenom mehanokemijske aktivacije (preuzeto uz suglasnost izdavača (42)).

Primjenom LC-HRMS i MS/MS tehnika identificirani su neki od razgradnih produkata PZQ i usporedbom s poznatim produktima zapaženo je da stvaranjem kompleksa s CD nastaju i novi, nikad identificirani razgradni produkti (tablica 6).

Tablica 6. Popis poznatih i pretpostavljenih razgradnih produkata PZQ i PZQ/CD kompleksa koji se formiraju pri uvjetima ubrzane razgradnje (40 °C i 75% RH, 3 mjeseca)^a (Preuzeto iz Špehar i suradnici (39) uz suglasnost izdavača).

ymbol	RRT	Observed <i>m/z</i>	Formula	Product ions, <i>m/z</i>	Proposed structure
I	0.57	148.0751	C ₉ H ₉ NO	130 (148–18), 105, 91, 79	
II	0.57	215.0812	C ₁₂ H ₁₀ N ₂ O ₂	197 (215–18), 187, 144, 127	
III	0.60	217.0966	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₂	199 (217–18), 189, 146, 129	
IV	0.77	345.1804	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₄	327 (345–18), 235, 217, 160, 83	
V	0.86	301.1804	C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O ₂	283 (301–18), 273 (301–28), 256, 191, 174, 146, 83	
VI	0.90	378.1812	C ₂₂ H ₂₃ N ₃ O ₃	257, 229, 201, 158	
VII	0.90	273.1959	C ₁₇ H ₂₄ N ₂ O	256, 163, 146, 83	
VIII	1.10	329.1864	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₃	219, 201, 188, 83	
IX	1.14	327.0785	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O ₃	271, 83	
X	1.17	311.1729	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O ₂	283, 201, 173, 132, 83	
XI	1.23	343.1688	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O ₄	325 (343–18), 233, 202, 174, 130, 83	

^aRRT = RT (degradation product)/RT(PZQ)

3.2.4. Priprema polimernih disperzija PZQ s povidonom i krospovidonom mehanokemijskom aktivacijom

B. Perissutti i suradnici (43) proveli su mljevenje PZQ u vibracijskim mlinovima uz dodatak polimera: povidona (PVP); kopovidona (1-vinilpirolidone-co-vinil acetat, PVPVA); natrijevog škrob glikolata (SSG) i mironiziranog krospovidona (CROSPVP). Pripravljene su binarne smjese u masenom omjeru PZQ/polimer 1:1 i 1:2. Eksperimenti mljevenja rađeni su u vibracijskom mlinu s posudama od cirkonijevog oksida uz dodatak jedne velike ili tri manje kuglice primjenom statističkog planiranja eksperimenata prema protokolu prikazanom u tablici 7.

Tablica 7. Protokol istraživanja pri mljvenju PZQ s polimerima kojeg su proveli Perissutti i suradnici (B. Perissutti i suradnici (43) preuzeto uz suglasnost izdavača).

eksperiment	X ₁ (wt)	X ₂	X ₃ /h	X ₄ /Hz	X ₅	Y ₁ /%	Y ₂ /%	Y ₃ /mgL-1
1	1:1	3s*	4	20	CROSPVP	9,61	87,22	436,77
2	1:1	3s	4	20	CROSPVP	11,99	89,93	448,26
3	1:1	11s*	4	30	PVPA	21,36	94,94	282,08
4	1:1	11s	4	30	PVPA	37,39	94,12	220,01
5	1:1	3s	1	30	SSG	69,37	100,00	285,59
6	1:1	3s	1	30	SSG	73,45	100,00	282,05
7	1:1	11s	1	20	PVP	42,54	94,60	229,49
8	1:1	11s	1	20	PVP	25,66	96,51	290,68
9	1:2	11s	1	30	CROSPVP	0	88,63	210,71
10	1:2	11s	1	30	CROSPVP	0	91,65	200,71
11	1:2	3s	1	20	PVPA	0	90,47	113,35
12	1:2	3s	1	20	PVPA	1,49	92,09	93,56
13	1:2	11s	4	20	SSG	0	90,32	127,48
14	1:2	11s	4	20	SSG	0	91,24	135,51
15	1:2	3s	4	30	PVP	0	94,13	110,11
16	1:2	3s	4	30	PVP	10,85	94,84	140,29

X₁ = maseni odnos djelatne tvari i polimera; Y₁ = ostatna kristainičnost PZQ (%)

X₂ = postavke mlina; Y₂ = sadržaj PZQ nakon mljevenja

X₃ = vrijeme mljevenja (h); Y₃ = povećanje topljivosti (mg/L)

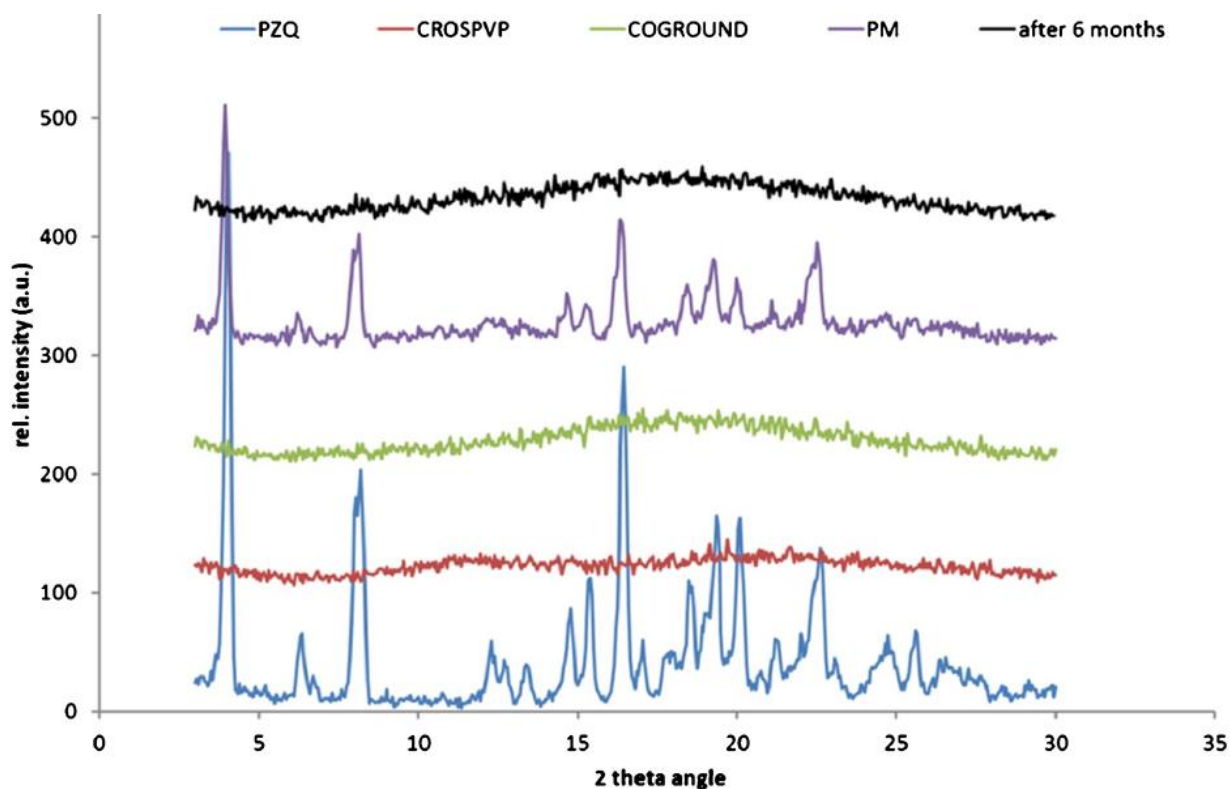
X₄ = frekvencija mlina

X₅ = vrsta polimera

3s* = 3 sfere od 15 mm

11s* = jedna velika sfera od 20 mm

Rezultati pokazuju da uklapanjem u polimerne disperzije raste topljivost PZQ porasla, a osim o vrsti polimera koji je korišten kao aditiv u procesu mljevenja, topljivost je proporcionalna s vremenom mljevenja. Najveće povećanje topljivosti primijećeno je za smjesu PZQ:CROSPVP (1:1), koja je mljevena 4 sata. U svim uzorcima došlo je do visokog stupanj amorfizacije (slika 11).



Slika 11. PXRD spektri čistog PZQ, čistog CROSPVPa, 1:1 fizičke smjese (PM), mljevenog produkta odmah nakon pripreme (COGROUND) te nakon 6 mjeseci (B. Perissutti i suradnici (43) preuzeto uz suglasnost izdavača).

Obzirom na utvrđenu sklonost PZQ razgradnji tijekom mljevenja, proveden je niz eksperimenata gdje su uzorci mljeveni pri sobnoj temperaturi i u kriogenim uvjetima (tablica 8).^a

^a For cryo-grinding (CC) experiments, prior to milling, the jars containing the samples were immersed in liquid nitrogen for 1 min; re-cooling of the milling jars with liquid nitrogen for 1 min was performed every 15 min of milling.

Tablica 8. Utjecaj tehnoloških parametara mljevenja na mjereni sadržaj i kristaliničnost PZG nakon mehanokemijske aktivacije (B. Perissutti i suradnici (43) preuzeto uz suglasnost izdavača).

eksperiment	Slučajni red	Varijable eksperimenta				Eksperimentalni odgovori	
		T/min	Frekvencija/Hz	Temperatura	formulacija	Sadržaj PZQ/%	Ostatna kristaliničnost/%
1	6	30	15	RT ^a	PZQ	100,00; 100,00	79,89; 86,89
2	10	90	15	RT	PZQ	100,00; 100,00	86,41; 71,34
3	11	30	25	RT	PZQ	100,00; 100,00	74,09; 72,69
4	15	90	25	RT	PZQ	99,97; 100,00	81,82; 80,84
5	18	30	15	CC ^b	PZQ	100,00; 100,00	72,31; 75,52
6	22	90	15	CC	PZQ	100,00; 100,00	44,93; 47,97
7	3	30	25	CC	PZQ	100,00; 100,00	22,48; 23,08
8	5	90	25	CC	PZQ	100,00; 100,00	2,37; 2,52
9	12	30	15	RT	PZQ:PVP	100,00; 100,00	48,47; 45,20
10	24	90	15	RT	PZQ:PVP	97,25; 96,84	5,66; 5,26
11	2	30	25	RT	PZQ:PVP	97,07; 95,88	29,66; 12,85
12	23	90	25	RT	PZQ:PVP	94,74; 95,35	36,76; 44,47
13	21	30	15	CC	PZQ:PVP	98,92; 98,79	47,18; 48,02
14	16	90	15	CC	PZQ:PVP	98,03; 97,76	10,29; 12,78
15	4	30	25	CC	PZQ:PVP	97,00; 96,82	7,29; 3,19
16	9	90	25	CC	PZQ:PVP	95,19; 95,79	0,00; 0,00
17	1	30	15	RT	PZQ:CROSPVP	100,00; 99,67	45,89; 47,68
18	20	90	15	RT	PZQ:CROSPVP	96,30; 96,48	16,14; 11,15
19	17	30	25	RT	PZQ:CROSPVP	96,32; 95,81	24,25; 11,05
20	19	90	25	RT	PZQ:CROSPVP	94,35; 95,18	12,31; 18,58
21	14	30	15	CC	PZQ:CROSPVP	98,91; 99,04	55,79; 53,70
22	7	90	15	CC	PZQ:CROSPVP	98,04; 97,76	7,82; 11,46
23	13	30	25	CC	PZQ:CROSPVP	96,32; 95,81	0,00; 0,00
24	8	90	25	CC	PZQ:CROSPVP	94,28; 94,18	4,05; 5,98

^aRT = room temperature

^bCC = cryogenic conditions (kriogeni uvjeti)

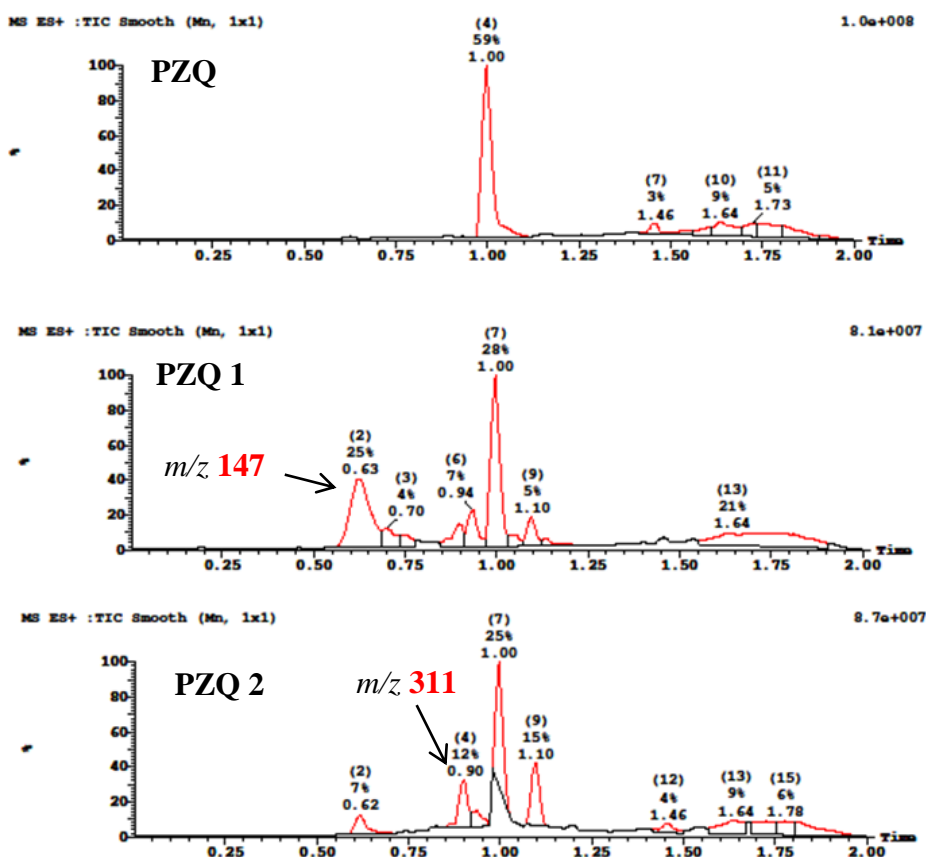
^c50:50 (w/w)

Prilikom određivanja sadržaja lijeka u pripremljenim uzorcima HPLC metodom, u kromatogramima je uočen novi pik na 4.0-4.2 min kojeg nije bilo moguće povezati s opisanim onečišćenjima opisanim za PZQ u monografijama djelatne tvari u Ph. Eur. i USP. Ovaj rezultat potaknuo je nastavak istraživanja (44) s ciljem identifikacije nastalih razgradnih produkata te je mehanokemijska sinteza provedena korištenjem polimera i pri uvjetima koji su u prethodnim studijama rezultirali najvećim stupnjem razgradnje lijeka (tablica 9).

Tablica 9. Sastav smjesa i procesni parametri mehanokemijske sinteze u studiji Šagud i suradnici koja je za cilj imala otkrivanje strukture razgradnih produkata nastalih tijekom mljevenja PZQ s PVP i CROSPVP (Šagud i suradnici (44) preuzeto uz suglasnost izdavača).

uzorak	Sastav (1:1 wt)	Vrijeme/ h	Frekvencija /Hz
PZQ1	PZQ:PVP	4	20
PZQ2	PZQ:CROSPVP	4	20
PZQ 3	PZQ:PVP	1,5	25
PZQ 4	PZQ:CROSPVP	1,5	25

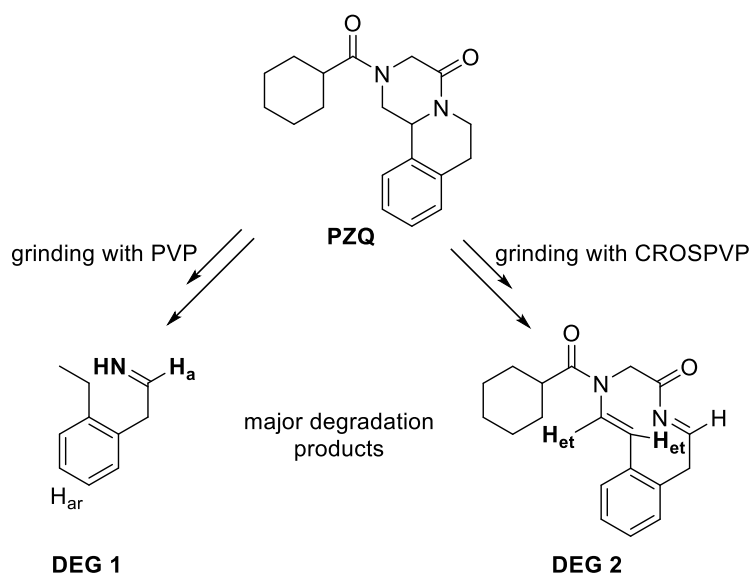
Za analizu uzoraka korištene su spektroskopske metode HPLC/MS, GC/MS i NMR. Već usporedbom GC kromatograma mljevenih smjesa s uzorkom PZQ vidljivo je bilo da dolazi do značajne razgradnje lijeka (slika 12).



Slika 12. Usporedba GC-MS kromatograma **PZQ** (najviši), **PZQ1** i **PZQ2** uzorka dobivenih mehanokemijskom obradom PZQ. (Šagud i suradnici (44) preuzeto uz suglasnost izdavača)

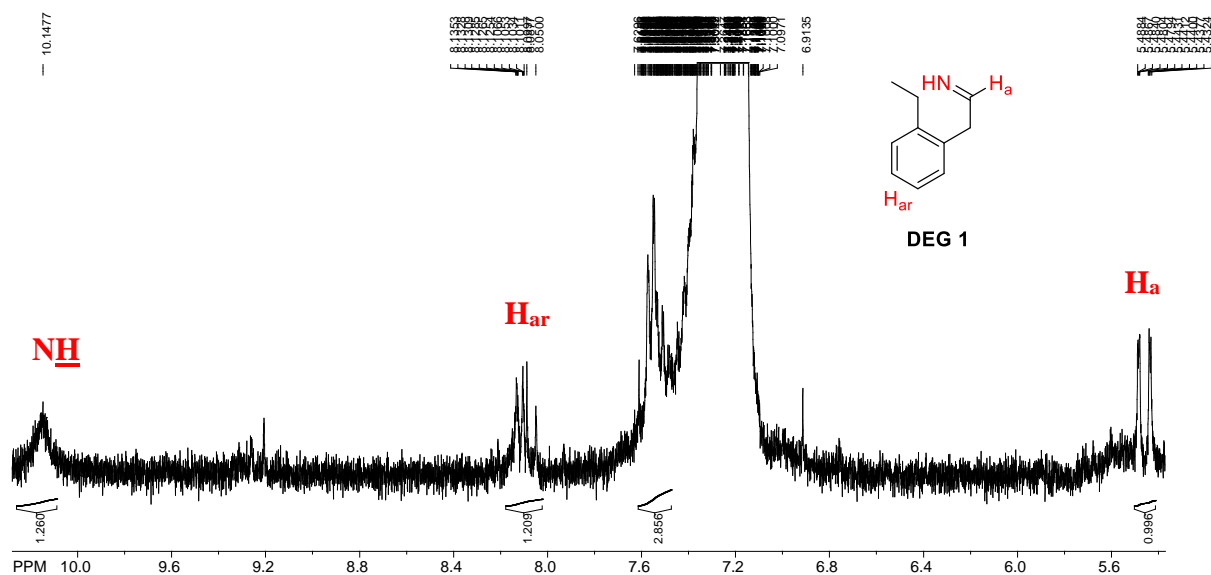
Rezultati pokazuju da ovisno o korištenom polimeru u procesu mljevenja PZQ dolazi do različitih putova razgradnje. U uzorcima **PZQ1** i **PZQ3** postoji veliki pik molekularne mase m/z 147 te mnoštvo manjih pikova masa m/z 311, 313 i 327 dok u uzorcima **PZQ2** i **PZQ4** pik m/z 147 je manjinski produkt dok je pik m/z 311 većinski produkt.

Da bi se dobile dodatne informacije o strukturi razgradnih produkata snimljeni su i ^1H NMR spektri. Na temelju svih informacija identificirane su najvjerojatnije strukture razgradnih produkata (slika 13).



Slika 13. Glavni razgradni produkti **DEG1** (m/z 147) i **DEG2** (m/z 311) nakon mljevenja PZQ u vibracijskom mlinu. (Šagud i suradnici (44) preuzeto uz suglasnost izdavača)

Razgradni produkt **DEG1** je varijacija strukture koja je identificirana prilikom studije fotokatalitičke oksidacije PZQ (36). Struktura je pretpostavljena na temelju studije NMR spektra **PZQ1** uzorka (slika 14) u kojem se vide signali specifični za ovu molekulu.

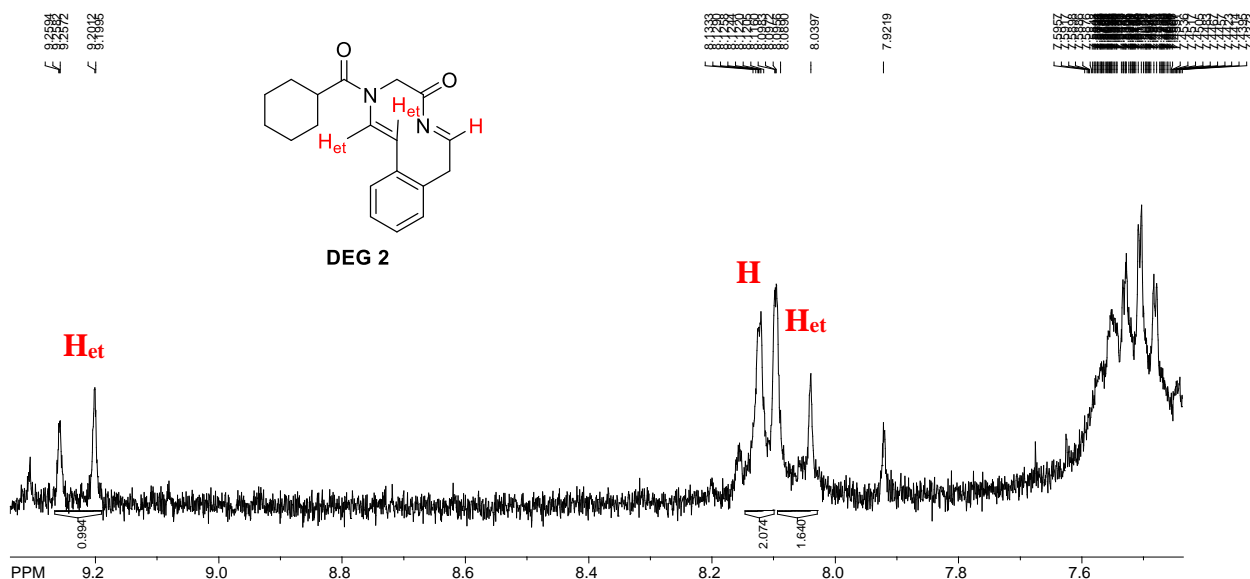


Slika 14. Dio ^1H NMR spektra uzorka **PZQ1**. (Šagud i suradnici (44) preuzeto uz suglasnost izdavača)

Struktura **DEG1** ima specifičan signal za NH skupinu te se razlikuje od prije pretpostavljene strukture dobivene fotolizom.

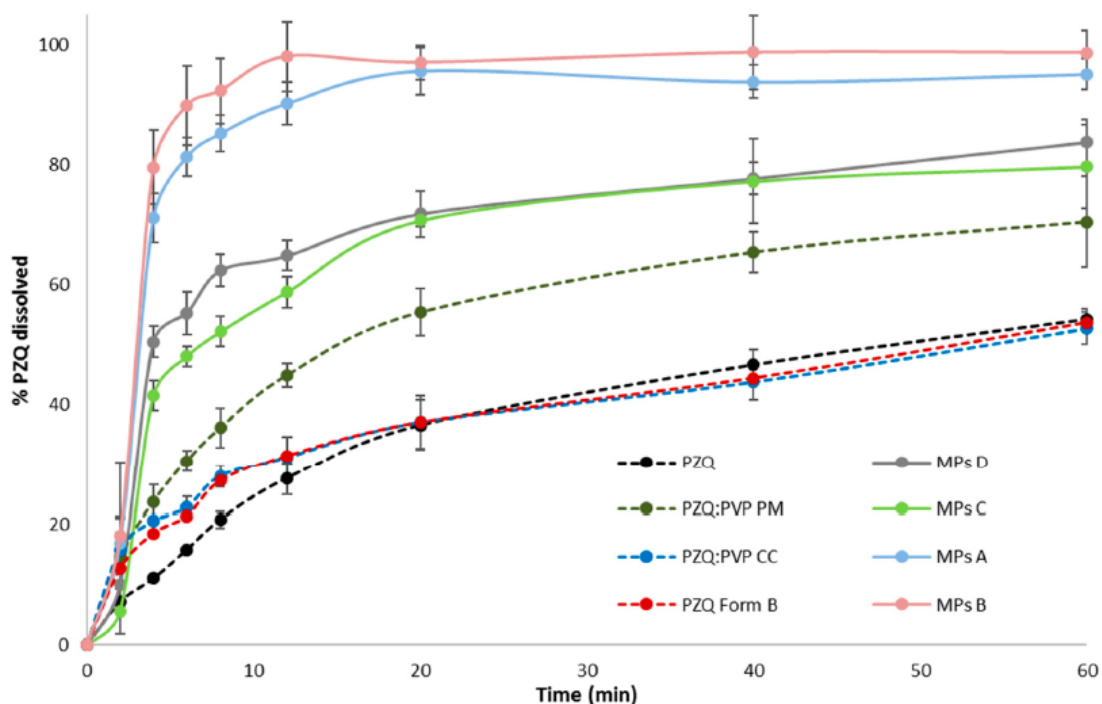
Postoji sprega NH i H_a protona (5,5 ppm) čija je konstanta $J_{\text{NH},\text{H}_a} = 14,6$ Hz. Proton na 8,1 ppm po pomaku spada u protone na aromatskom prstenu, a ostatak aromatskih protona nalazi se u multipletu na 7,5-7,6 ppm. Sve ovo dalo je čvrstu potvrdu strukture **DEG1**.

Većinski razgradni produkt **DEG2** koji nastaje tijekom mljevenja s CROSPVP polimerom, mase m/z 311, također je strukturno potvrđen ^1H NMR spektroskopijom (slika 15). Ovdje su u NMR spektru vidljivi etenski protoni s konstantom sprege od 17,3 Hz, što znači da su u trans orijentaciji jedan s drugim. Ovi protoni pomaknuti su daleko u niže polje, što govori o tome da se nalaze u kemijskog okolini koja ih otklanja. U ovom slučaju efekt otklanjanja uzrokuje atom dušika te benzenska jezgra. Kemijske transformacije koje bi dovele do ovakvog degradacijskog produkta uključuju cijepanje jednostruke veze između C atoma i N atoma te formiranje dvije nove konjugirane veze.



Slika 15. Dio ^1H NMR spektra uzorka **PZQ2**. (Šagud i suradnici (44) preuzeto uz suglasnost izdavača)

Polimerne disperzije PZQ s PVP te novi polimorfni oblik B pripremljeni mehanokemijskom aktivacijom uklopljene su u daljnjim su istraživanjima u mikročestice pripremljene tehnologijom sprej-kogeliranja koristeći Gelucir 50/13, neionski surfaktant, kao nosač (45). Cilj je bio razviti farmaceutski oblik lijeka prikladan za primjenu u pedijatrijskoj populaciji. Provedena je detaljna fizikalno-kemijska i farmaceutsko-tehnološka karakterizacija pripremljenih uzoraka. Usporedbom *in vitro* profila oslobađanja djelatne tvari, vidljivo je da pripremljene mikročestice pokazuju značajnije povećanje brzine oslobađanja lijeka u odnosu na čvrste forme PZQ (slika 16), što se može pripisati dodatnom učinku korištenog surfaktanta. U takvom sustavu mehanokemijski aktivirani oblici lijeka tvore čvrste disperzije (nanokristalne ili amorfne) te čvrste otopine (u potpunosti amorfne). *In vitro* ispitivanja učinkovitosti PZQ protiv *Schistosoma mansoni* parazita su pokazala da se uklapanjem aktiviranih oblika PZQ ne mijenja njegov terapijski učinak. Od razvijenih sustava, mikročestice s uklopljenom B formom PZQ pokazuju najveći potencijal za daljnji razvoj pedijatrijske formulacije ovog lijeka.



Slika 16. *In vitro* profili oslobađanja PZQ za različite polimorfne oblike PZQ i polimerne disperzije s PVP pripremljene mehanokemijskom aktivacijom, same ili uklopljene u mikročestice s Geluciom 50/13 (preuzeto iz Albertini i suradnici (45)).

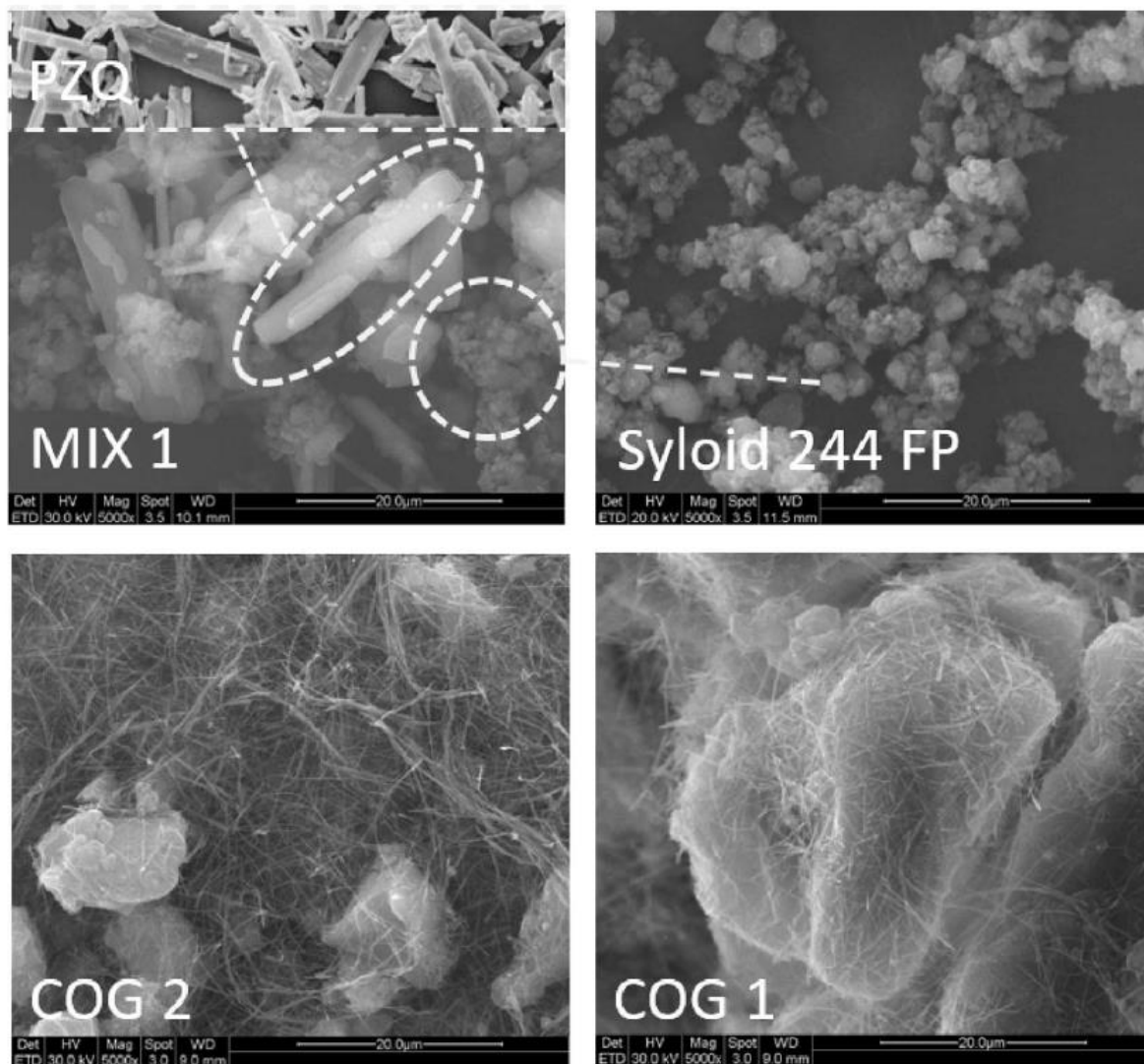
3.2.5. Mljevenje PZQ s mezoporoznim silicijevim dioksidom

Mezoporozni materijali zanimljivi su za upotrebu u farmaceutici zbog toga što mogu stabilizirati nestabilne amorfne oblike te povećati topljivost kao i brzinu oslobađanja djelatne tvari u organizmu (46). Deponiranje molekula djelatne tvari u otvore mezoporoznih materijala obično uključuje upotrebu prikladnih organskih otapala u kojima je sama djelatna tvar topljiva (47). Obzirom da je izbjegavanje velikih količina organskih otapala poželjno, razvijaju se i ekološki prihvatljivije tehnologije za deponiranje djelatnih tvari, bez upotrebe otapala, „*solvent-free*“.

U nedavnom istraživanju Šagud i suradnika (48), PZQ je podvrgnut suhom mljevenju uz dodataka Syloid 244 FP^b, sintetičkog silicijevog dioksida. Uzorci su pripremljeni pri masenom omjeru lijeka i Syloid 244 FP 1:1, uz mehaničku aktivaciju mljevenjem u vibracijskom mlinu, koristeći posude i radna tijela od cirkonijevog oksida, uz frekvenciju mljevenja od 25 Hz. Promjene u fizikalnim karakteristikama praćene su DCS i XRPD metodama, a sadržaj lijeka u mljevenim uzorcima određen je HPLC-UV metodom. Pokazalo

^b SYLOID® 244 FP material is a synthetic amorphous silica

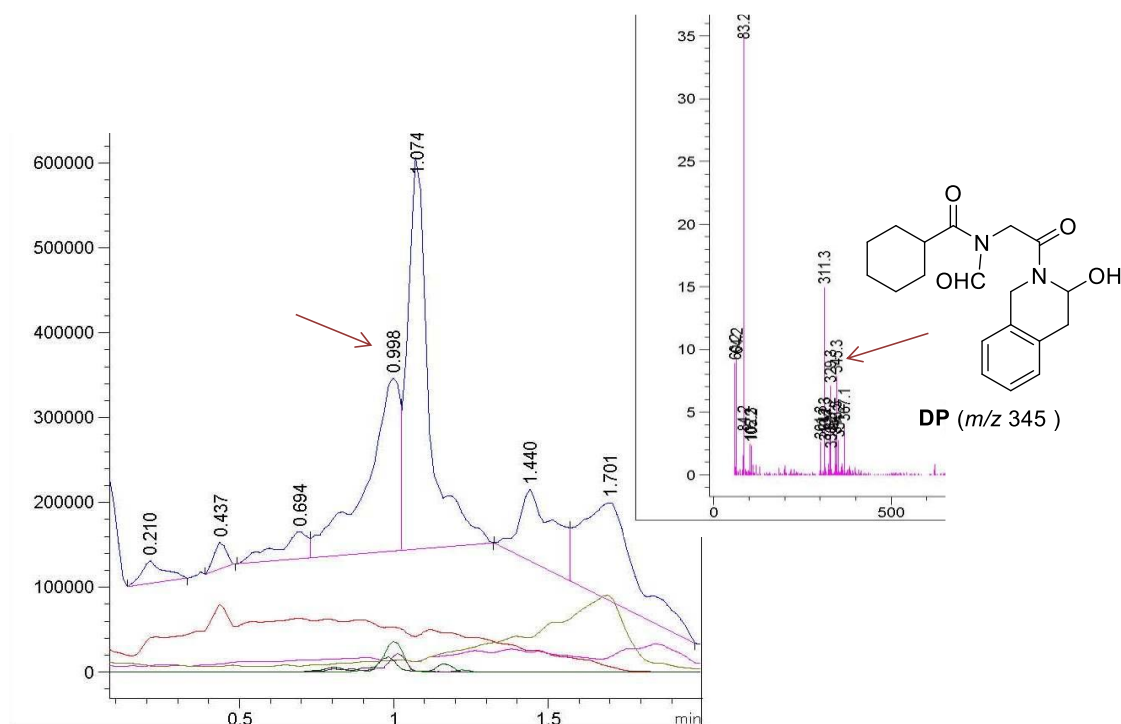
se da mljevenje sa silikatom promovira nastajanje amorfne krutine u vrlo kratkom roku, već nakon 15 minuta (slika 17).



Slika 17. SEM slike (5000x povećanje): a) PZQ; b) Syloid 244 FP; c) COG 2 (30 min); COG 1 (15 min). (Šagud i suradnici (48) preuzeto uz suglasnost izdavača)

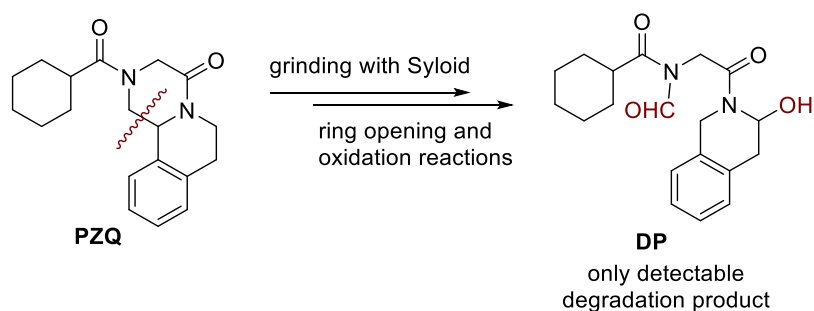
Obzirom na brzi prelazak lijeka u amorfni oblik bilo je vrlo važno ispitati kemijsku stabilnost lijeka u sustavu. HPLC analiza mljevenih uzoraka pokazala je da mljevenjem pri sobnoj temperaturi dolazi do parcijalne razgradnje djelatne tvari i smanjenja njenog sadržaja u mljevenim produktima. Smjese **COG 1** karakterizira sadržaj PZQ od $96.12\% \pm 0.35$, a smjesa **COG 2** $96.08\% \pm 0.51$. U slučaju Syloida, čak i fizička smjesa pripremljena miješanjem u tarioniku pokazuje smanjenje u sadržaju lijeka na $98.48\% \pm 0.48$. Ovakvo ponašanje povezano je s činjenicom da čestice silikata imaju visoko abrazivno djelovanje i intrinzičnu tvrdoću.

Analiza razgradnih produkata provedena je primjenom HPLC-MS i NMR analiza. U kromatogramima uzoraka mljevenih sa Syloidom 244 FP utvrđeno je da postoji novi pik pri m/z 345 (slika 18).



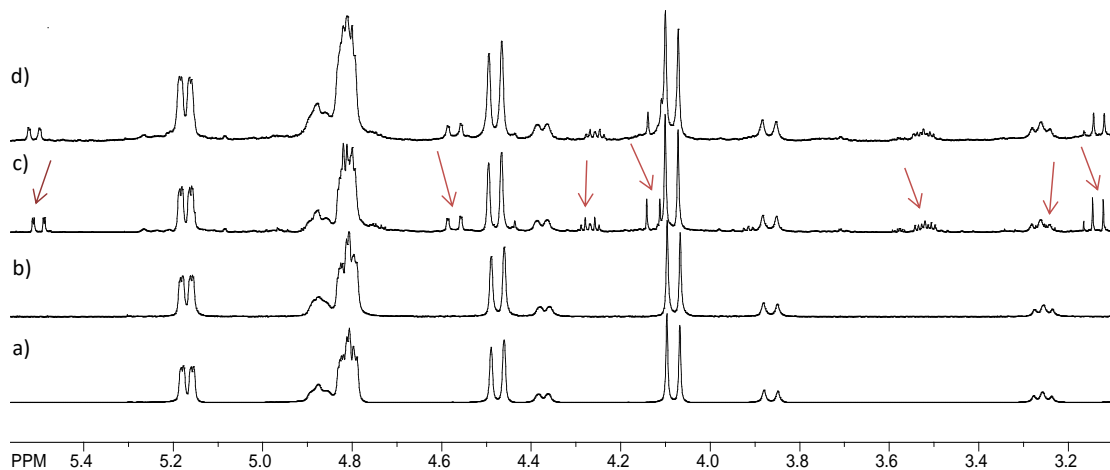
Slika 18. Kromatogram COG 1 uzorka s masenim spektrom novog pika na 0,998 min. (Šagud i suradnici (48) preuzeto uz suglasnost izdavača)

Fragmenti koji su dobiveni u masenom spketru (m/z 329) ukazuju na gubitak kisika, dok fragment m/z 311 ukazuje na mogući gubitak vode. Ove informacije iskorištene su da se pretpostavi najvjerojatnija struktura razgradnog produkta **DP 1** (shema 1).



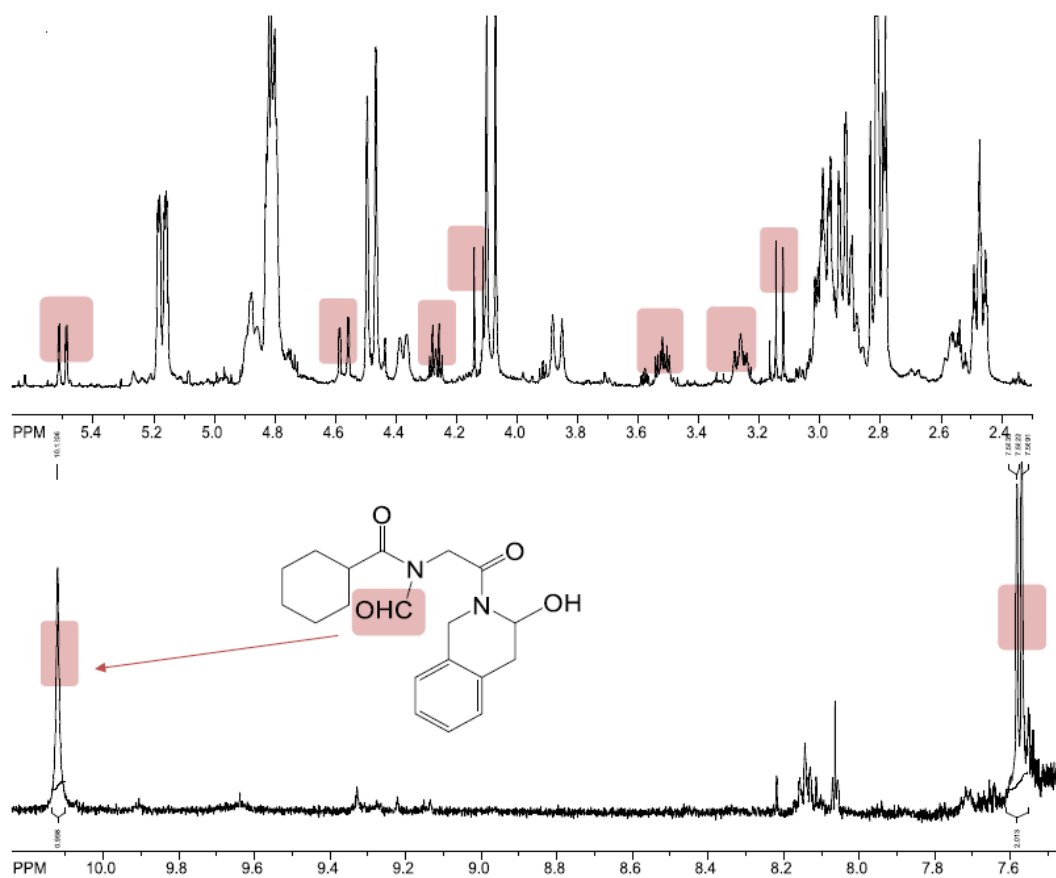
Shema 1. Razgradni produkt PZQ nastao prilikom mljevenja uz dodatak Syloida 244 FP .
(Šagud i suradnici (48) preuzeto uz suglasnost izdavača)

Detaljna analiza ^1H NMR spektara potvrdila je strukturu pretpostavljenu za DP 1 kao najizgledniju (slika 19).



Slika 19. Usporedba ^1H NMR spektara a) **PZQ**, b) **MIX 1**, c) **COG 1**, d) **COG 2**. (Šagud i suradnici (48) preuzeto uz suglasnost izdavača)

Vide se karakteristični signali CHO skupine u nižem polju na 10.1 ppm, te signali na 5.5. i 2.5 ppm sa sličnim konstantama sprege kao protoni u samom PZQ (slika 20). Ova dva protona pokazuju da je dio cikloheksanskog kostura ostao isti.



Slika 20. Alifatski i aromatski dijelovi ^1H NMR spektra **COG 1**. (Šagud i suradnici (48) preuzeto uz suglasnost izdavača)

Obzirom da razgradni produkt ima CHO i OH skupine, Kemijske transformacije koje bi mogle biti uključene u njegovo formiranje su otvaranje prstena te oksidacija. Ovakva struktura ne pripada ranije karakteriziranim razgradnim produktima, što ukazuje na nove mehanizme raspada.

3.2.6. Mljevenje PZQ s površinski aktivnim tvarima

Mljevenje uz dodatak površinski aktivnih tvari novi je pristup za unapređenje topljivosti i brzine otapanja PZQ. Gaggero i suradnici (49) proveli su mehanokemijsku aktivaciju PZQ uz dodatak poloksamera F-127 (Pluronic) i saharoze stearata (Surfhope). U tablici 10 prikazani su tehnološki parametri tijekom pripreme uzoraka mljevenjem u vibracijskim mlinovima.

Tablica 10. Pregled pripremljenih uzoraka i tehnoloških parametara mljevenja uz prikaz temperature uzorka i analitičkog povrata sadržaja lijeka nakon mljevenja (preuzeto iz Gaggero i suradnici (49) uz suglasnost izdavača).

Oznaka uzorka	Pomoćna tvar	Omjer (wt)	Vrijeme mljevenja/min	Temperatura uzorka nakon mljevenja	Sadržaj PZQ*/%
P-G-1A	-	-	30	29,31±0,28	98,91±0,11
P-G-1B	-	-	90	29,27±0,14	98,47±0,06
P-G-2A	F-127	20:1	30	29,85±0,64	99,39±0,15
P-G-2B			90	30,34±0,00	99,51±0,01
P-G-3A	C 1816	20:1	30	29,42±0,14	99,23±0,08
P-G-3B			90	27,57±0,14	99,40±0,03
P-G-4A	F-127	10:1	30	29,30±0,28	98,98±0,11
P-G-4B		10:2		29,25±0,07	101,39±0,12
P-G-4C		10:3		29,41±0,14	99,95±0,03
P-G-5A	C 1816	10:1	30	28,10±0,28	100,79±0,13
P-G-5B		10:2		28,15±0,07	101,00±0,18
P-G-5C		10:3		28,15±0,49	101,00±0,13

*odnos između sadržaja PZQ u uzorku određenog pomoću kromatografije (HPLC) i teorijske količine PZQ u uzorku određene vaganjem tijekom pripreme uzorka za mljevenje.

Provedena je detaljna fizikalno-kemijska karakterizacija uzoraka, s posebnim osvrtom na sadržaj lijeka u uzorcima (Tablice 10 i 11). Također, provedena su ispitivanja topljivosti i *in vitro* brzine otapanja lijeka, a *in vitro* permeabilnost iz razvijenih sustava ispitana je na monosloju Caco-2 stanica.

Tablica 11. Pregled fizikalno-kemijskih karakteristika (talište, entalpija taljenja i relativna kristaliničnost lijeka u uzorku) i parametara *in vitro* oslobađanja lijeka iz analiziranih uzoraka. Postotak oslobođene djelatne tvari nakon 15 min ($Q_{15\text{min}}$) služi za procjenu brzine otapanja, a učinkovitost oslobađanja nakon 60 minuta ($DE_{60\text{min}}$) omogućuje procjenu opsega procesa. (preuzeto iz Gaggero i suradnici (49), uz suglasnost izdavača)

uzorak	$T_{\text{onset}}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H_{\text{fuz}}/\text{Jg}^{-1}$	RDC/%	$Q_{15\text{min}}/\%$	$DE_{90\text{min}}/\%$
PZQ	140,23	95,52	100,00	8,05±1,60	26,72±3,40
P-GR-1A	135,70	75,57	79,11	26,01±1,44	48,59±3,52
P-GR-1B	134,32	70,21	73,51	15,53±1,45	31,19±2,29
P-PM1	139,29	89,96	99,01	70,45±3,06	77,73±2,34
P-GR-2A	136,46	90,83	95,09	41,05±1,27	49,42±1,95
P-GR-2B	133,06	72,79	76,20	46,68±6,35	58,53±1,72
P-PM2	137,21	88,71	97,62	56,49±2,14	46,52±3,88
P-GR-3A	132,89	76,23	79,80	43,33±1,34	52,37±1,98
P-GR-3B	130,38	62,63	65,57	10,72±0,78	43,68±4,06
P-GR-4A	136,47	80,26	84,02	62,27±1,71	69,22±0,74
P-GR-4B	135,97	76,08	79,64	68,79±3,45	73,67±5,52
P-GR-4C	134,13	73,03	76,45	71,46±1,07	91,52±1,09
P-GR-5A	133,77	72,29	75,68	59,36±1,15	71,96±3,99
P-GR-5B	130,02	69,12	72,36	66,45±5,19	79,39±3,15
P-GR-5C	128,11	65,37	68,43	77,62±1,28	81,69±2,06

P-PM1 i P-PM2 su fizičke mješavine PZQ sa F-127 i C 1816, u oba slučaja omjer je 20:1.

Rezultati pokazuju da mljevenje PZQ s površinski aktivnim tvarima pridonosi topljivost i oslobađanju lijeka *in vitro* (Tablica 10), što se može pripisati djelomičnoj amorfizaciji PZQ tijekom mljevenja te lokalnom učinku površinski aktivne tvari tijekom otapanja. Prisutnost površinski aktivnih tvari nije utjecala na intrinzički dobru permeabilnost lijeka. Naime, koeficijent permeabilnost (P_{app}) za PZQ iznosio je $(4.04 \pm 0.72) \times 10^{-5} \text{cm s}^{-1}$, dok je za produkte pripremljene mljevenjem s poloksamerom i sukroza stearatom $(4.44 \pm 0.33) \times 10^{-5} \text{cm s}^{-1}$, odnosno $(4.00 \pm 0.17) \times 10^{-5} \text{cm s}^{-1}$. Iako je vrijednost P_{app} za produkt s poloksamerom nešto veća u odnosu na onaj za čisti lijek i produkt sa sukroza stearatom, ta razlika nije statistički značajna ($p > 0.05$). Dobra topljivost i permeabilnost lijeka preduvjeti su za uspješnu apsorpciju lijeka oralnom primjenom.

Primjenom UPLC-MS i ^1H NMR spektroskopijom praćena je i kemijska stabilnost PZQ u uvjetima mljevenja, obzirom na prethodne primjere pokazane nestabilnosti. Pokazalo se kako mljevenje s površinski aktivnim tvarima nije uzrokovalo pad u sadržaju lijeka u ispitivanim uzorcima, a u spektrima nisu uočeni signali koji bi upućivali na prisustvo novih ili poznatih razgradnih produkata. Ovo bi indiciralo da su dvije ispitivane površinske tvari prikladni aditivi za proces mljevenja, omogućujući unapređenje biofarmaceutskih karakteristika lijeka uz izbjegavanje njegove kemijske razgradnje u samom procesu.

4. RASPRAVA

4.1. Teorijski putevi razgradnje PZQ

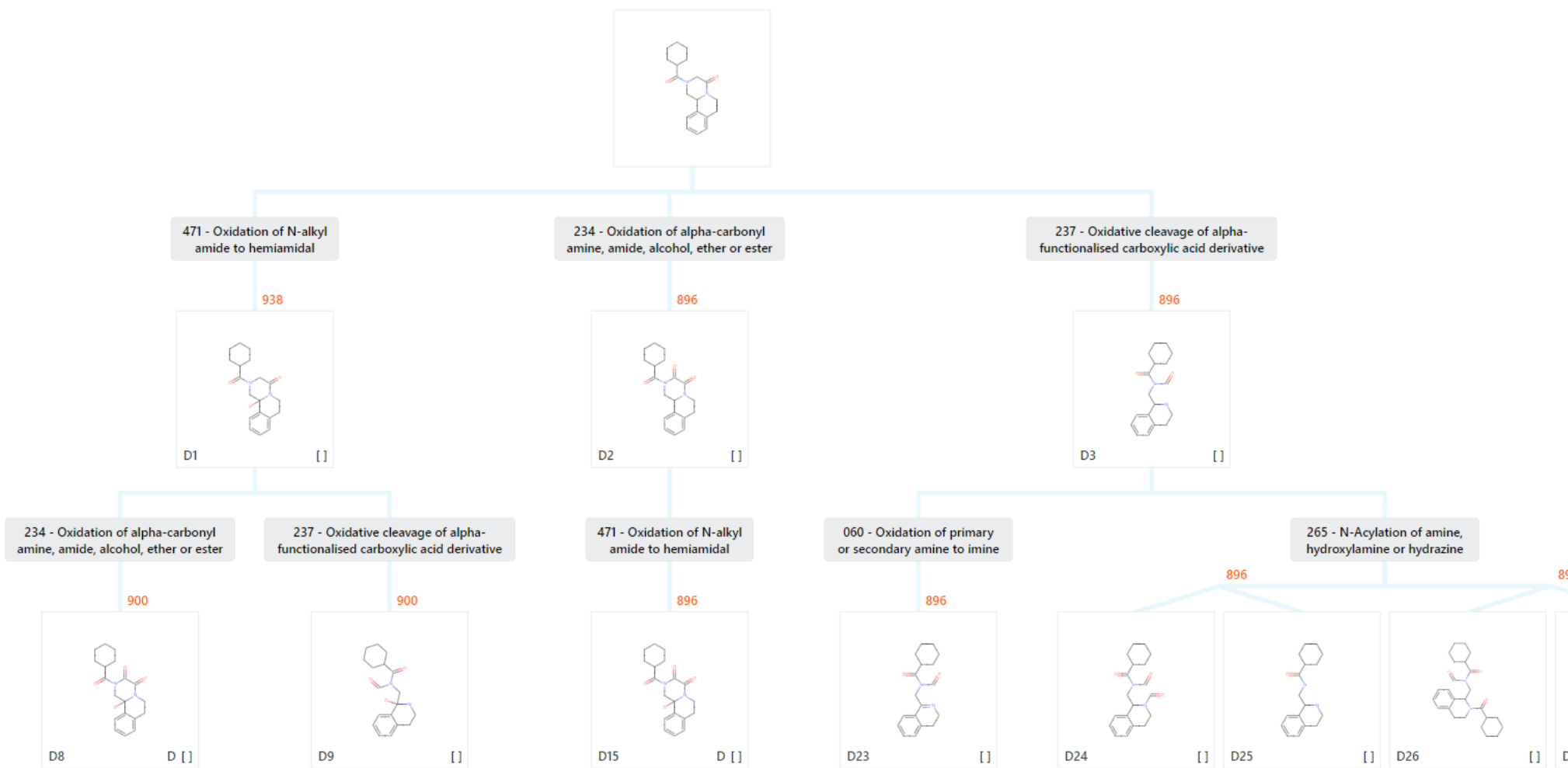
PZQ je mala molekula koja u svojoj strukturi sadrži šesteročlani heksanski prsten te pirazino-izokinolinski prsten. Dobro su opisani njegovi putovi razgradnje u razne metabolite unutar organizma. Opisano je 17 metabolita koji nastaju iz oba enantiomera tijekom prvog prolaza kroz jetru (slika 2, poglavlje 1.2.). Ovako visok stupanj metaboličkog raspada pokazuje povišenu biokemijsku reaktivnost PZQ što je indikativno i za određenu kemijsku nestabilnost same molekule, odnosno sklonost kemijskim transformacijama.

Tijekom pregleda literaturnih podataka o produktima PZQ pripremljenih mehanokemijskom aktivacijom uočen je, izoliran i identificiran veći broj razgradnih produkta. Da bi se mljevenje, kao proces optimizacije biofarmaceutskih svojstava lijekova, moglo uključiti u industrijsku proizvodnju PZQ, potrebno je dobro raščlaniti sve moguće putove razgradnje i objasniti njihove mehanizme u svrhu otklanjanja nestabilnosti djelatne tvari tijekom mljevenja i kontrole procesa formulacije lijeka u budućnosti.

Primjenom SAR programa Lhasa Zeneth^c, moguće je lakše objasniti neke razgradne puteve PZQ čiji su produkti eksperimentalno dokazani, a možda i predvidjeti, te izbjeći nove. Zeneth je software koji omogućava predviđanje mogućih puteva razgradnje u određenim uvjetima temperature, tlaka, pH, termičke i fotokemijske katalize. PZQ je u programu prepoznat po specifičnim strukturnim dijelovima molekule koji su više ili manje reaktivni. Računalni program je na postavkama, gotovo sigurnih transformacija (89,2% vjerojatnost) u relativno blagim uvjetima (prisutno svjetlo, zrak i/ili kisik, temperatura 20⁰C, po potrebi radikalski inicijatori ili peroksidi) predvidio puteve na slici 22, tablica 11.

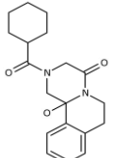
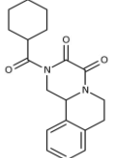
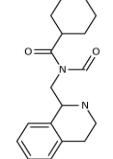
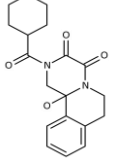
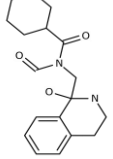
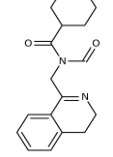
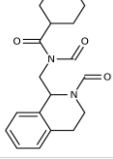
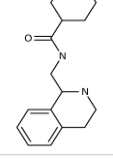
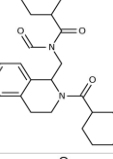
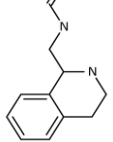
Za PZQ su predviđena tri tipa reakcija koje se s visokom vjerojatnošću mogu dogoditi na molekuli. Sve ove reakcije spadaju u područje su foto ili termo katalizirane oksidacije (slika 21).

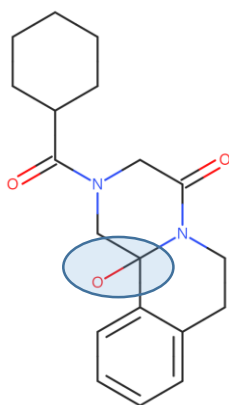
^c Zeneth program 8.1.1., Zeneth Knowledge Base 2020.1.0.



Slika 21. Putevi razgradnje PZQ predviđeni primjenom programa Lhasa Zeneth.

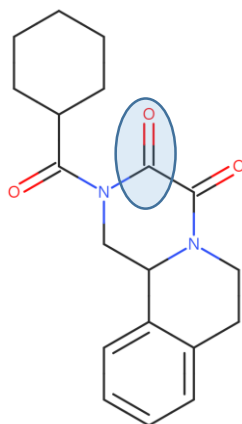
Tablica 12. Putevi razgradnje PZQ predviđeni primjenom programa Lhasa Zeneth

Structure	Transformation Name	Transformations	Condition Triggers	Exact M	Mass Diff	Transformation References
	Oxidation of N-alkyl amide to hemiamidal	Oxidations	Oxygen; Radical or Light	328,1787	15,9949	(1) Mechanism of the photooxidation of amides, Sharkey WH and Mochel WE, 1959, Journal of the American Chemical Society, 81, 3000-3005 (2) The oxidative dealkylation of tertiary amides: mechanistic aspects, Illey J and Tolando R, 2000, Journal of the Chemical Society: Perkin Transactions 2, , 2328-2336
	Oxidation of alpha-carbonyl amine, amide, alcohol, ether or ester	Oxidations	Oxygen; Radical	326,163	13,9792	(1) The captodative effect, Viehe HG, Janousek Z, Merenyi R and Stella L, 1985, Accounts of Chemical Research, 18, 148-154 (2) Susceptibility of morpholine substituents to photo-oxidative decomposition-identification of photo-oxidative degradants of linezolid (PNU-100766), Martin GE, Robins RH, Bowman PB, Duholke WK, Farley KA, Kaluzny BD, Guido JE, Sims SM, Thamann TJ, Thompson BE, Nishimura T, Noro Y and Tahara T, 1999, Journal of Heterocyclic Chemistry, 36, 265-270
	Oxidative cleavage of alpha-functionalised carboxylic acid derivative	Oxidations	Oxygen; Radical	300,1838	-12	(1) The captodative effect, Viehe HG, Janousek Z, Merenyi R and Stella L, 1985, Accounts of Chemical Research, 18, 148-154 (2) Susceptibility of morpholine substituents to photo-oxidative decomposition-identification of photo-oxidative degradants of linezolid (PNU-100766), Martin GE, Robins RH, Bowman PB, Duholke WK, Farley KA, Kaluzny BD, Guido JE, Sims SM, Thamann TJ, Thompson BE, Nishimura T, Noro Y and Tahara T, 1999, Journal of Heterocyclic Chemistry, 36, 265-270
	Oxidation of alpha-carbonyl amine, amide, alcohol, ether or ester	Oxidations	Oxygen; Radical	342,158	29,9742	(1) The captodative effect, Viehe HG, Janousek Z, Merenyi R and Stella L, 1985, Accounts of Chemical Research, 18, 148-154 (2) Susceptibility of morpholine substituents to photo-oxidative decomposition-identification of photo-oxidative degradants of linezolid (PNU-100766), Martin GE, Robins RH, Bowman PB, Duholke WK, Farley KA, Kaluzny BD, Guido JE, Sims SM, Thamann TJ, Thompson BE, Nishimura T, Noro Y and Tahara T, 1999, Journal of Heterocyclic Chemistry, 36, 265-270
	Oxidative cleavage of alpha-functionalised carboxylic acid derivative	Oxidations	Oxygen; Radical	316,1787	3,9949	(1) The captodative effect, Viehe HG, Janousek Z, Merenyi R and Stella L, 1985, Accounts of Chemical Research, 18, 148-154 (2) Susceptibility of morpholine substituents to photo-oxidative decomposition-identification of photo-oxidative degradants of linezolid (PNU-100766), Martin GE, Robins RH, Bowman PB, Duholke WK, Farley KA, Kaluzny BD, Guido JE, Sims SM, Thamann TJ, Thompson BE, Nishimura T, Noro Y and Tahara T, 1999, Journal of Heterocyclic Chemistry, 36, 265-270
	Oxidation of primary or secondary amine to imine	Oxidations	Metal or Light or Radical; Oxygen; pH	298,1681	-14,0157	(1) Stress testing: the chemistry of drug degradation, Baertschi SW, Alsante KM and Santafianos D, in: Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation (Drugs and the Pharmaceutical Sciences, volume 210), Baertschi SW, Alsante KM and Reed RA, 2nd edition, Informa Healthcare, London, 2011, 49-141
	N-Acylation of amine, hydroxylamine or hydrazine	Condensations		328,1787	15,9949	(1) Aliphatic nucleophilic substitution, Smith MB and March J, in: March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 5th edition, John Wiley and Sons, New York, 2001, 389-674
	N-Acylation of amine, hydroxylamine or hydrazine	Condensations		272,1889	-39,9949	(1) Aliphatic nucleophilic substitution, Smith MB and March J, in: March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 5th edition, John Wiley and Sons, New York, 2001, 389-674
	N-Acylation of amine, hydroxylamine or hydrazine	Condensations		410,2569	98,0731	(1) Aliphatic nucleophilic substitution, Smith MB and March J, in: March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 5th edition, John Wiley and Sons, New York, 2001, 389-674
	N-Acylation of amine, hydroxylamine or hydrazine	Condensations		190,1106	-122,0732	(1) Aliphatic nucleophilic substitution, Smith MB and March J, in: March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 5th edition, John Wiley and Sons, New York, 2001, 389-674



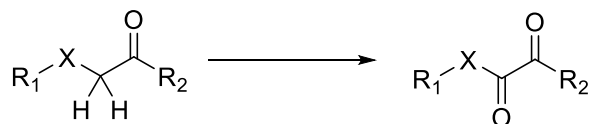
Slika 22. Mogući produkt oksidacije PZQ u hemiamidal.

Jedan od mogućih puteva oksidacije *N*-alkil-amida koji sadrže vodikove atome na α -položaju je oksidacija molekularnim kisikom, ako postoje određeni katalizatori kao što su radikali ili svjetlo (50). Pri tome bi mogao nastati hemiamidal kakav je prikazan na slici 22. Oksidacija se u teoriji može dogoditi i na α -karbonilnom ugljikovom atomu i s druge strane amida (slika 23).



Slika 23. Mogući produkt oksidacije α -karbonilne amidne skupine na molekuli PZQ

Teorijska reakcija oksidacije kakvu je programski software koristio za predviđanje ovakvog ponašanja molekule PZQ prikazan je na shemi 2.



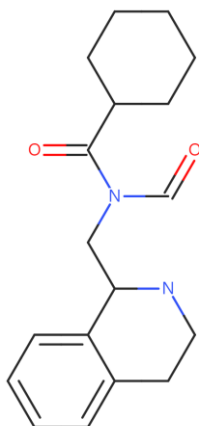
X = O ili N-R3
R1-R3 = bilo koji atom

veza R1-N-R3 može biti dio aromatskog sustava

Shema 2. Reakcija oksidacije α -karbonilnih amida

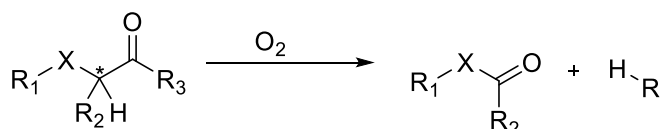
Opisani mogući mehanizam započinje ekstrakcijom vodika od strane metilenskog ugljikova atoma, a rezultirajući radikal tada reagira s kisikom i nastaje hidroperoksi-radikal koji može uzeti vodik od bilo kojeg dostupnog donora pri čemu nastaje hidroperoksid. Obzirom da hidroperoksidi nisu stabilni dolazi to eliminacije i nastaje α -karbonil-karboksilna kiselina ili neki njezin derivat (51).

Treći tip oksidacije koji je moguće zamisliti na molekuli PZQ je oksidativno cijepanje, mogući produkt ovakve reakcije prikazan je na slici 24.



Slika 24. Mogući degradacijski produkt oksidativnog cijepanja PZQ

Do oksidativnog cijepanja teoretski može doći na strukturama koje imaju α -funkcionalizirane karboksilne kiseline ili derivate (shema 3).



X = O ili N-R4

R1, R4 = bilo koji atom (osim vodika)

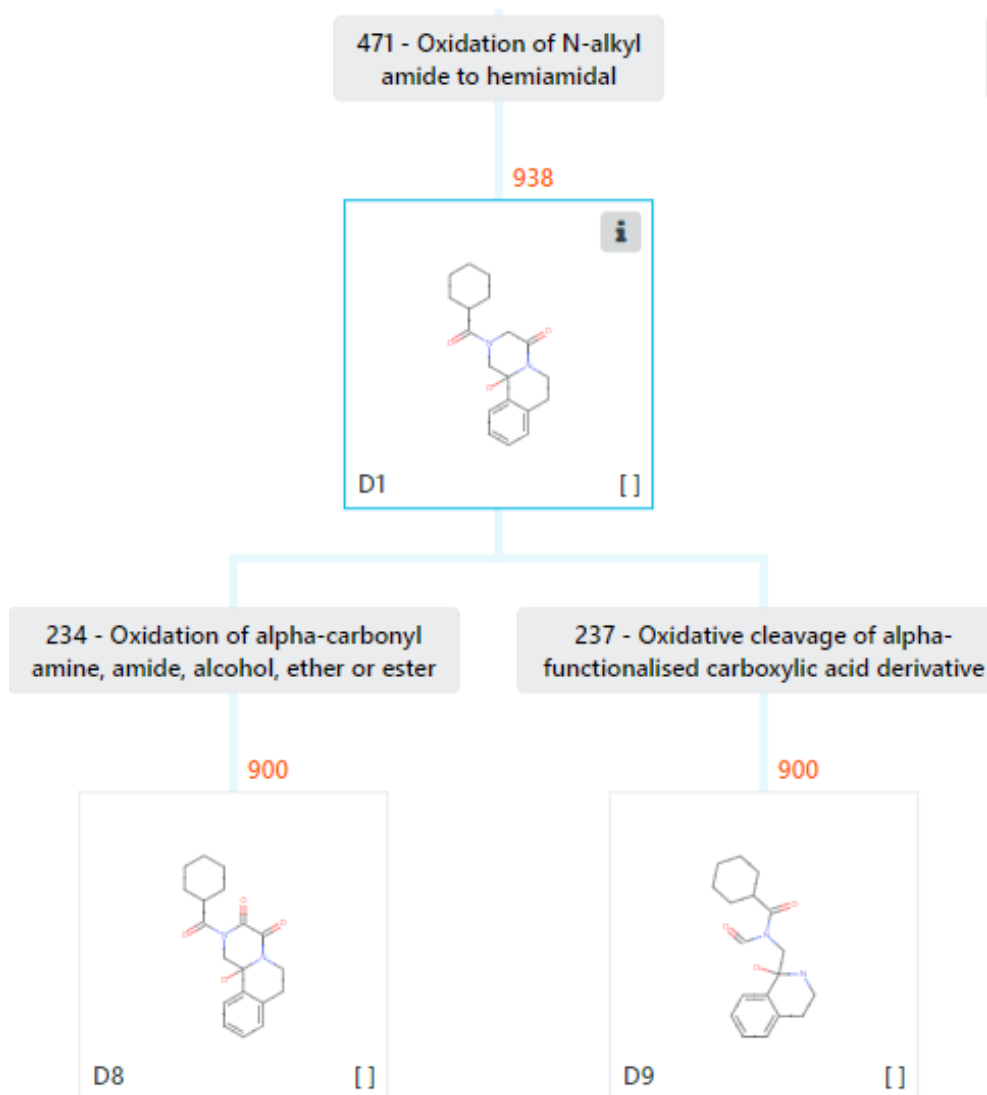
R2 =vodik ili ugljik

R3 bilo koji heteroatom (bez vodika na sebi)

*ovaj C atom ne može biti u prstenu

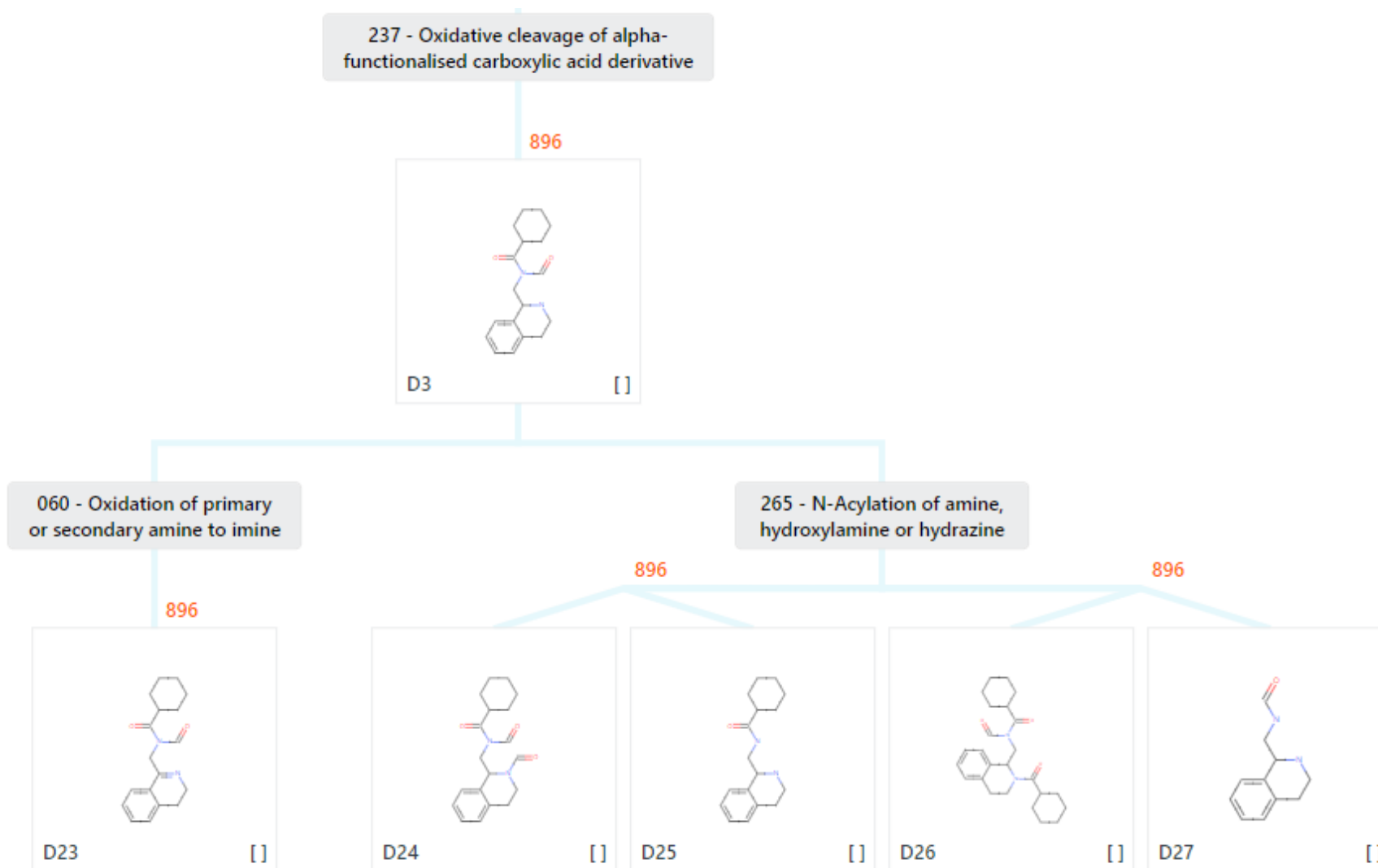
Shema 3. Oksidativno cijepanje funkcionalizirane karboksilne kiseline.

Razlika između mehanizma i puta koji vodi u oksidativno cijepanje ili druge opisane derivate oksidacije je samo u tome kako će se ponašati primarno stvoreni nestabilni međuprodukt, hidroperoksid. Ovakva tri moguća razgradna produkta, primarno nastala oksidacijom uz neki pogodni inicijator (najčešće svjetlo), mogu u istim uvjetima reagirati dalje što je prikazano i na slici 25.



Slika 25. Reakcije oksidacije na primarno dobivenom hemidialu.

Hemiamidal se može i dalje oksidirati ili oksidativno cijepati, pri čemu mogu nastati produkti prikazani na slici 25 sa 90% vjerojatnošću koju program pretpostavlja. Produkt **D9** dobiven oksidativnim cijepanjem, obzirom na svoju strukturu i veći broj funkcionalnih skupina, ima više načina na koje može reagirati, obzirom na prisutne uvjete (slika 26).

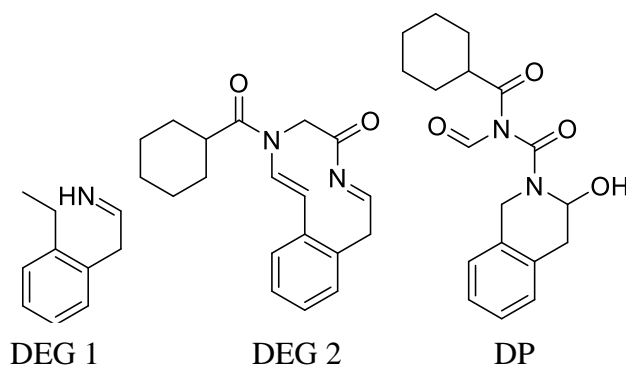


Slika 26. Moguće reakcije produkta oksidativnog cijepanja.

Ovakav niz reakcija oksidacije može se dalje teorijski zamišljati kroz veliki broj koraka, u kojem stupnju će razgradnja stati, ovisiti će o dostupnim reagensima, uvjetima i vremenu. Važno je naglasiti da su na otvorenim produktima razgradnje, koji imaju NH skupine vrlo izgledne i reakcije *N*-aciliranja, gdje će slobodni sekundarni amin reagirati s acilnim halidima, anhidridima, imidima, itd.

4.2. Usporedba mehanizama nastanka teorijski i literaturno opisanih razgradnih produkata PZQ

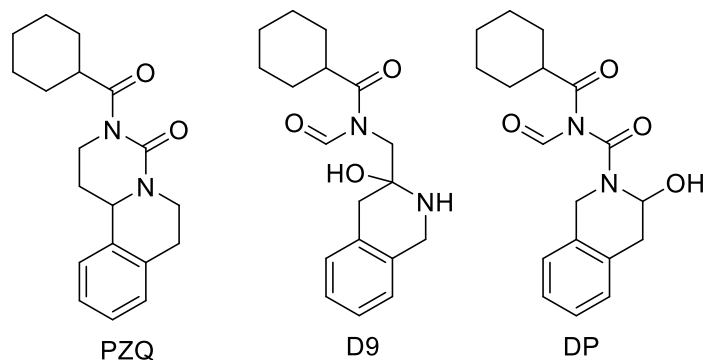
Razgradni produkti nastali tijekom procesa mljevenja PZQ čije su strukture uzete u obzir u daljnjim usporedbama su one koje su pretpostavljene koristeći dvije metode analiza (MS i NMR) i oni su pobrojani na slici 27. Obzirom da je ostatak struktura identificiran samo na temelju HPLC/MS i MS/MS fragmentacije bez potvrde NMR analize, te strukture nemaju dovoljnu potvrdu da bi bile korisne za mehanističko razmatranje razgradnih procesa.



Slika 27. Tri poznate i opisane razgradne strukture PZQ nastale u procesu mehanokemijske aktivacije

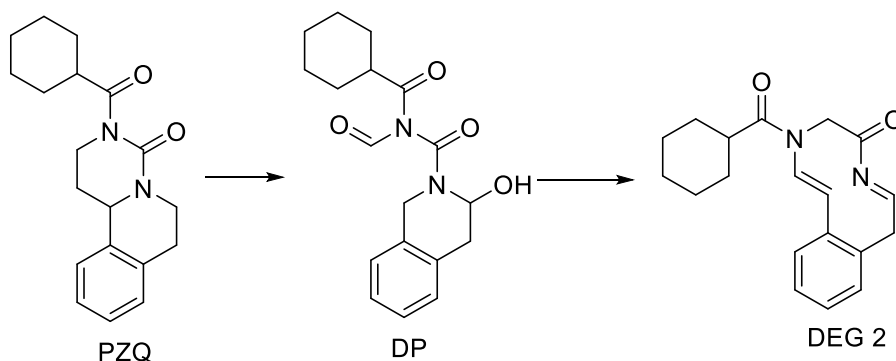
Prilikom pretpostavki reakcija koje su mogle doći u obzir tijekom nastanka ovih opisanih razgradnih produkata, sami autori su u obzir uzeli određene primarne reakcije oksidacija koje su se mogle dogoditi, što je u skladu s teorijskim pretpostavkama SAR programa Zeneth. U radu gdje je PZQ mljeven sa silikatima kao aditivima, glavni razgradni produkt bio je **DP** (48). Autori pretpostavljaju da dolazi do otvaranja jednostruke C-C veze na šesteročlanom prstenu, nakon koje slijedi daljnja oksidacija, obzirom da molekula u sebi ima vrlo karakteristične CHO i OH skupine. Obzirom na Zenethova teorijska predviđanja, najvjerojatnije je došlo do oksidativnog cijepanja, međutim, ne nužno na teorijski pretpostavljeni način, obzirom da je struktura **D9**, vrlo slična strukturi **DP** koja je u realnosti

identificirana, samo što je u stvarnosti došlo oksidacijskog otvaranja prstena na drugom mjestu (slika 28).



Slika 28. Usporedba struktura **PZQ**, **D9** i **DP**.

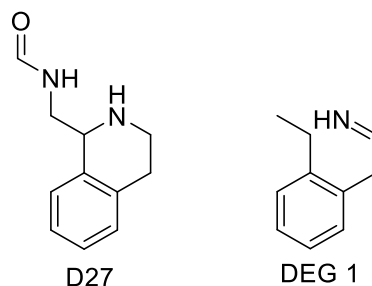
Razgradni produkti koji su identificirani prilikom mljevenja PZQ s polimerima PVP i CROSPVP su u potpunosti drugačijih struktura, međutim moguće je usporediti **DEG2** i **DP** i pretpostaviti da je DEG 2 produkt sekundarnih reakcija na DP (shema 4).



Shema 4. Mogući put nastanka DEG 2.

Kod **DEG 2** dolazi do otvaranja jednostruke C-C veze na šesteročlanom prstenu, te de to intramolekulske reciklizacije. Prilikom ovog otvaranja dolazi do naknadne eliminacije koja vodi u krajnji produkt. Moguće je mehanistički pretpostaviti da je primarna reakcija ponovno oksidacija na samom prstenu, što je dovodi do poremećaja u elektronskoj gustoći, pucanja C-C veze i eliminacije vode. Software na temelju dostupnih podataka ne može pretpostaviti sa dovoljnom sigurnošću reakcije koje se mogu dogoditi nakon početne reakcije oksidacije tako da nastanak razgradnog produkta **DEG2** nije *in silico* detektiran, ali se uklapa u pretpostavljeni tip reakcija kojima PZQ podliježe.

Razgradni produkt **DEG1** koji je također uočen tijekom mljevenja s polimerima je fragment produkta **DEG2** koji u daljnjem slijedu reakcija nastaje cijepanjem iz istih međuprodukata. Molekula međuprodukta ne stabilizira se u tom slučaju eliminacijom vode, već dolazi do cijepanja molekule u dva stabilnija fragmenta, najbliži pretpostavljeni fragment bio bi **D27** (slika 29).



Slika 29. Usporedba strukture **D27** i **DEG 1**.

4.3. Teorijski putevi optimizacije kemijske stabilnosti PZQ tijekom mehanokemijske aktivacije

Mehanokemijska aktivacija mljevenjem sa ili bez dodatka odgovarajućih aditiva pokazala je veliki potencijal za modifikaciju nepovoljnih biofarmaceutskih svojstava PZQ, u provom redu topljivosti i brzine oslobađanje djelatne tvari. Novi polimorfni oblici kao i inkluzijski kompleksi pripremljeni mehanokemijskom aktivacijom pokazuju prikladnu stabilnost.

Obzirom na sklonost PZQ razgradnji određenim uvjetima, kod planiranja i optimiranja daljnjih eksperimenata, trebalo bi uzeti u obzir da eksperimentalno i teorijski dokazane reakcije razgradnje PZQ uglavnom reakcije oksidacije, katalizirane svjetlom ili temperaturom. Obzirom da je tijekom procesa mljevenja uzorak zaštićen od svjetla u neprozirnim metalnim posudama za mljevenje, potrebno je usmjeriti napore za učinkovitije praćenje i održavanje niske temperature tijekom procesa mljevenja. Mljevenje je naime visokoenergetski proces koji generira značajno zagrijavanje uzorka s obzirom da se svega 2% primijenjene mehaničke energije troši za usitnjavanje. Kriogeni uvjeti možda nisu nužnu, ali temperature ispod sobne bile bi prihvatljive. Za sada su na tržištu dostupni vibracijski mlinovi koji osiguravaju kontrolu temperature tijekom procesa mljevenja (<https://www.retsch.com/products/milling/ball-mills/mm-500-control/>), ali oni su veličinom prikladni samo za laboratorijsku primjenu, dok će razvoj termostatisiranih mlinova za proizvodnju u industrijskom mjerilu biti izazovan.

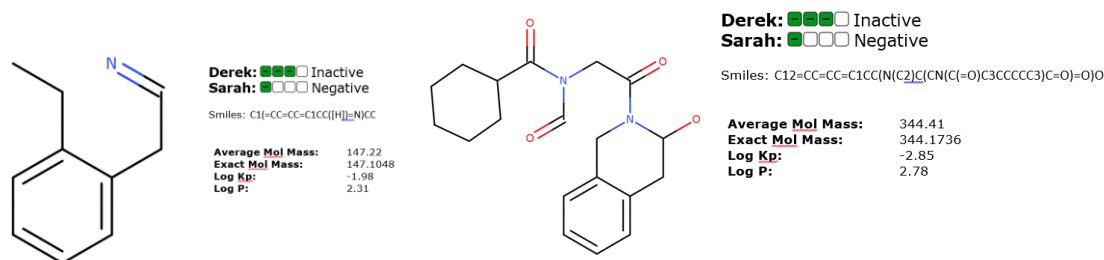
Drugi nepovoljni čimbenik je sam kisik, obzirom da se velik broj reakcija i u samoj farmaceutskoj industriji provodi pod inertnom atmosferom dušika, eksperimente mljevenja gdje je došlo do razgradnje, trebalo bi ponoviti uz način da se prethodno aparatura propuše argonom ili dušikom i hermetički zatvori. Ovakav put planiranja daljnjih istraživanja u području mogao bi dati nove uvide u same mehanizme razgradnje te omogućiti razvoj procesa mehanokemijske aktivacije u većem mjerilu.

4.4. Mutageni potencijal identificiranih razgradnih produkata

Kad se onečišćenja promatraju u kontekstu sigurnosti primjene djelatne tvari i lijeka, dopuštene granice regulirane su ICH Q3A/3B i M7 smjernicama obzirom na dozu i na sama svojstva onečišćenja. Iz tog razloga iznimno je važno da su onečišćenja u djelatnim tvarima i farmaceutskim oblicima lijekova dobro poznata i da je njihova struktura identificirana tako da se može istražiti njihov mutageni potencijal. Onečišćenja koja se pokazuju da imaju poznata ili pretpostavljena mutagena i/ili kancerogena svojstva kontrolirat će se u lijeku na puno nižim granicama od onih koja nisu PMI po smjernicama opisanim u ICH M7.

Ako su onečišćenja nova i dosad neopisana te ne postoje toksikološke *in vivo* studije, za procjenu mutagenog potencijala koriste se *in silico* softverski alati koji rade na principu SAR analiza. Najpoznatiji je Lhasin M7 software^d koji kombinira Lhasa Derek i Lhasa Sarah bazu podataka i daje predviđanje mutagenog/kancerogenog potencijala za nove molekule temeljem statističkih predviđanja i odnosa strukture i aktivnosti pojedinih ključnih dijelova molekule.

Identificirani produkti degradacije PZQ tijekom procesa mehanokemijske aktivacije obrađeni su primjenom Lhasin M7 software. Statistička analiza na temelju veze između mutagenog/kancerogenog potencijala i strukturnih elemenata u molekuli (SAR) pokazala je kako molekule **DEG1** i **DP** nemaju u svojoj strukturi alarmirajuće funkcionalne skupine (slika 30).

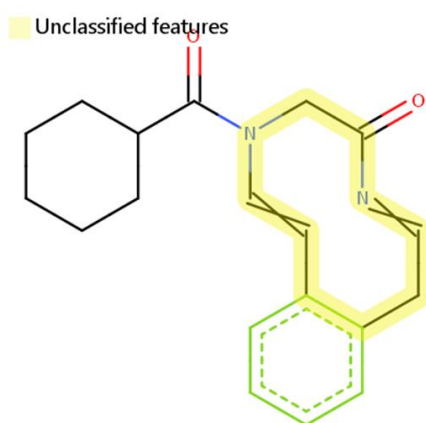


Slika 30. Lhasa Derak i Sarah predikcije mutagenosti za **DEG1** i **DP**.

^d Nexus v.2.5.2 (Build 5, Jul 2022); Derek Nexus v.6.2.1; Sarah Nexus v.3.2.1

Ovakav negativan rezultat signalizira kako ove strukture i njihovi funkcionalni dijelovi teorijski i statistički gledano nemaju mutageni/kancerogeni potencijal te da se mogu pratiti u djelatnoj tvari i/ili lijeku na razini svih ostalih onečišćenja.

Struktura **DEG2** nije dala niti pozitivan, niti negativan rezultat, obzirom da ključan strukturni dio (slika 31) nije poznat u bazama podataka za daljnju usporedbu. Obzirom da se uzima konzervativni pristup, ova molekula smatrala bi se pozitivnom i na nju bi se primijenila najniža moguća granica dopuštene dnevne količine, od AI 1.5 µg/danu.



Slika 31. Funkcionalno neklasificirani dio molekule **DEG2**.

Ova molekula može se sintetizirati neovisnom sintezom ili radikalnijom primjenom uvjeta u kojima je i nastala, pročistiti te dati na AMES analizu. AMES test je *in vitro* bakterijska analiza kojom je moguće procijeniti mutageni potencijal neke molekule (52). Najčešće se koriste specifično mutirane bakterije iz sojeva *Salmonella* i *E. Coli*. Spojevi koje želimo testirati moraju biti iznimno kemijski pročišćeni i bez onečišćenja organskog i anorganskog podrijetla da bi rezultati koji su dobiveni imali smisla. Ako se neka molekula pokaže negativnom na *in vitro* Ames testu ovaj rezultat je tada dovoljan da se to onečišćenje u djelatnoj tvari i/ili lijeku može promatrati na granicama svih ostalih onečišćenja.

5. ZAKLJUČAK

PZQ je djelatna tvar koja se koristiti u liječenju raširene tropske bolesti uzrokovane s pet različitih vrsta parazita *Shitostoma* vrste. Obzirom da bolest pogađa najranjiviju populaciju u nerazvijenim državama ovaj lijek se s razlogom na listi esencijalnih lijekova svjetske zdravstvene organizacije. Istraživanja posvećena poboljšanju njegovih farmakoloških karakteristika od jednake su važnosti kao i istraživanja posvećena njegovoj što ekonomičnijoj sintezi i formulaciji.

Farmakodinamička i farmakokinetička svojstva PZQ još se uvijek istražuju i važna su za daljnje poboljšanje svojstava lijeka, obzirom da njegova terapijska učinkovitost varira pod utjecajem je brojnih faktora (dužina zaraze, konzumacija hrane, drugi lijekovi, itd). Prilikom razvoja novih formulacija također je bitno obratiti pažnju na činjenicu da je lijek smjesa enantiomera od kojih je samo jedan biološki aktivan te kako sama djelatna tvar kao racemična smjesa spada u BCS klasu II.

Poboljšanje topljivosti, unapređenje oslobađanja djelatne tvari iz lijeka, apsorpcije te same stabilnosti prilikom prvog prolaska kroz jetru su prioritetni u daljnjim istraživanjima, a obzirom na sintezu znanja skupljenu tijekom ovog rada prilikom planiranja i optimiranja daljnjih eksperimenata svakako treba uzeti u obzir i sklonost razgradnji PZQ pri određenim uvjetima. Mehanokemija, kao jedan od alata „zelene kemije“ sigurno će i dalje biti u fokusu i u istraživanjima vezanima na poboljšanje svojstava PZQa. Pri budućim mehanokemijskim aktivacijama važno je imati na umu da su reakcije koje su eksperimentalno i teorijski pokazano moguće na ovoj molekuli uglavnom reakcije oksidacije, katalizirane svjetlom ili temperaturom.

Obzirom da se mehanokemijske reakcije odvijaju u mlinovima gdje svjetlo nije prisutno, potrebno je pratiti temperaturu. Ono što je vidljivo kako kriogeni uvjeti nisu nužni, ali temperature ispod sobne bile bi poželjne u svrhu uklanjanja rizika od razgradnje djelatne tvari.

Drugi važan čimbenik u reakcijama oksidacije je sam kisik. U farmaceutskoj proizvodnji djelatne tvari i lijeka velik tehnoloških operacija se provodi pod atmosferom dušika te bi eksperimente mljevenja u kojima je došlo do razgradnje, trebalo ponoviti u inertnoj atmosferi. Inertnu atmosferu u laboratorijskom mjerilu najlakše je postići na način da se prethodno aparatura propuše argonom ili dušikom i hermetički zatvori te ostane zatvorena

tijekom cijelog eksperimenta mljevenja. Kod uvećanja procesa mogu se uvesti kontinuirana uvođenja dušika ili argona u mlinove tijekom cijelog trajanja procesa mljevenja, prikladnim načinima.

Planiranje daljnjih eksperimenata uzimajući u obzir ova saznanja mogao bi dati nove uvide u same mehanizme razgradnje PZQa te omogućiti razvoj procesa mehanokemijske aktivacije u većem mjerilu. Određena svojstva i nestabilnosti same djelatne tvari također se mogu dodatno modificirati dodatkom pogodnih novih aditiva, koji će uz poboljšanje farmakoloških svojstava i stabilizirati samu djelatnu tvar i zaštititi je od reakcije oksidacije tijekom procesa mehanokemijske aktivacije.

6. LITERATURA

1. Reich MR, Goindaraj R. Dilemmas in drug development for tropical diseases. Experiences with praziquantel *Health Policy* 1998; 44: 1 – 18
2. Groll E. Praziquantel *Adv Pharmacol*, 1984; 20: 219 – 38
3. Andrews P, Thomas H. Praziquantel. *Med Res Rev* 1983; 3(2): 147 – 200
4. Wegner DH. The profile of the trematocidal compound praziquantel. *Arzneimittel-Forschung (Drug Research)*, 1984; 34(II) (96): 1132 – 6.
5. Seubert J, Pohlke R, Loebick F. Synthesis and properties of praziquantel, a novel broad spectrum anthelmintic with excellent activity against schistosomes and cestodes *Experientia* 1997; 33:1036 – 7
6. Liu LX, Weller PF. Antiparasitic drugs. *N Engl J Med* 1996; 334: 1178 – 84.
7. WHO Model List of Essential Medicines – 22nd List (ažurirano 2021.)
8. Utzinger J, Raso G, Brooker S, De Savigny D, Tanner M, ØRnbjerg N, *et al.* Schistosomiasis and neglected tropical diseases: towards integrated and sustainable control and a word of caution *Parasitology*. 2009; 136(13): 1859–74
9. Zdesenko G, Mutapi F. Drug metabolism and pharmacokinetics of praziquantel: A review of variable drug exposure during schistosomiasis treatment in human hosts and experimental models. *PLoS Negl Trop Dis* 2020; 14(9): e0008649
10. Meyer T, Sekljic H, Fuchs S, Bothe H, Schollmeyer D, Miculka C, Taste A. New Incentive to Switch to (R)-Praziquantel in Schistosomiasis Treatment. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 3(1): e357
11. Castro, N, Medina, R, Sotelo J, Jung, H. Bioavailability increases with concomitant administration of food. *Antimicrob Agents Chemoter* 2000; 44: 2903–2904
12. Bittencourt PRM, Gracia CM, Martins R. Phenytoin and carbamazepine decrease oral bioavailability of praziquantel. *Neurology* 1992; 42: 492–496
13. Gonnert R, Andrews P. Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. *Z F Parasitenkunde* 1977; 52: 129–50
14. Olliaro PL, Vaillant M, Hayes DJ, Montresor A, Chitsulo L. Practical dosing of praziquantel for schistosomiasis in preschool-aged children. *Trop Med Int Health* 2013; 18(9): 1085-1089.
15. Lhasa Zeneth Program, 8.1.1.; Zeneth Knowledge Base 2020.1.0.
16. Supratik K, Sanderson H, Roy K, Benfenati E, Leszczynski J. Green Chemistry in the Synthesis of Pharmaceuticals. *Chem Rev* 2022; 122(3): 3637–3710
17. Mishra M, Sharma M, Dubey R, Kumari P, Ranjan V, Pandey J. Green synthesis interventions of pharmaceutical industries for sustainable development, *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 2021; 4: 100174
18. Colombo I, Grassi G, Grassi M. Drug mechanochemical activation, *J Pharm Sci* 2009; 98(11): 3961-3986
19. Boldyrev VV. Mechanochemical modification and synthesis of drugs. *J Mater Sci* 2004; 39: 5117–5120
20. Dayan A. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics, *Acta Trop.* 2003; 86: 141–159
21. Chaud MV, Lima AC, Vila MMDC, Paganelli MO, Paula FC, Pedreiro LN, *et al.*, Development and evaluation of praziquantel solid dispersions in sodium starch glycolate *Trop J Pharm Res* 2013; 12: 163–168
22. Becket G, Schep LJ, Tan MY. Improvement of the in vitro dissolution of praziquantel by complexation with α -, β - and γ -cyclodextrins. *Int J Pharm* 1999; 179: 65–71
23. Bertoni S, Hasa D, Albertini B. *et al.* Better and greener: sustainable pharmaceutical manufacturing technologies for highly bioavailable solid dosage forms. *Drug Deliv Transl Res* 2022; 12: 1843–1858

24. Francisca A, das Neves J, Martins J P, Granja P L, Santos H A, Sarmiento B. Functionalized materials for multistage platforms in the oral delivery of biopharmaceuticals, *Prog Mater Sci* 2017; 89: 306-344
25. Zanolli D, Perissutti B, Passerini N, Chierotti MR, Hasa D, Voinovich D, *et al.* A new soluble and bioactive polymorph of praziquantel, *Eur J Pharm Biopharm.* 2018; 127: 19-28
26. Zanolli D, Perissutti B, Vioglio PC, Chierotti MR, Gigli L, Demitri N, *et al.* Exploring mechanochemical parameters using a DoE approach: Crystal structure solution from synchrotron XRPD and characterization of a new praziquantel polymorph, *Eur J Pharm Sci* 2019; 140: 105084
27. Saikia B, Seidel-Morgenstern A, Lorenz H. *Crystal Growth & Design* 2021; 21 (10): 5854-5861
28. Banerjee M, Nimkar K, Naik S, Patravale V. Unlocking the potential of drug-drug cocrystals – A comprehensive review, *J Controlled Release*, 2022; 348: 456-469
29. Espinosa-Lara C, Guzman-Villanueva D, Arenas-Garcia JI, Herrera-Ruiz D, Rivera-Islas J., Roman-Bravo P *et al.* Cocrystals of active pharmaceutical ingredients -Praziquantel in combination with oxalic, malonic, succinic, maleic, fumaric, glutaric, adipic, and pimelic acids, *Cryst Growth Des* 2013; 13: 169–185
30. Sánchez-Guadarrama O, Mendoza-Navarro F, Cedillo-Cruz A, Jung-Cook H, Arenas-García JI, Delgado-Díaz A *et al.* Chiral Resolution of *RS*-Praziquantel via Diastereomeric Co-Crystal Pair Formation with l-Malic Acid, *Cryst Growth Des* 2016; 16: 307–314
31. Cugovčan M, Jablan J, Lovrić J, Cinčić D, Galić N, Jug M. Biopharmaceutical characterization of praziquantel cocrystals and cyclodextrin complexes prepared by grinding, *J Pharm Biomed Anal* 2017; 137: 42-53
32. Yang, S, Liu, Q, Ji W, An Q, Song J, Xing C *et al.* Cocrystals of Praziquantel with Phenolic Acids: Discovery, Characterization, and Evaluation. *Molecules* 2022; 27: 2022
33. Leal J, Smyth HDC, Ghosh D. Physicochemical properties of mucus and their impact on transmucosal drug delivery. *Int J Pharm* 2017; 532: 555-572
34. Jansook P, Ogawa N, Loftsson T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *Int J Pharm.* 2018; 535: 272-284
35. de Jesus, MB, de Matos Alves Pinto L, Fraceto LF, Magalhães L A, Zanotti-Magalhães EM, de Paula, E. Improvement of the Oral Praziquantel Anthelmintic Effect by Cyclodextrin Complexation. *J Drug Targeting* 2010; 18: 21–26
36. de Jesus MB, de Matos Alves Pinto Fraceto LF, Takahata Y, Lino ACS, Jaime C, de Paula E. Theoretical and experimental study of a praziquantel and beta-cyclodextrin inclusion complex using molecular mechanic calculations and H¹-nuclear magnetic resonance. *J Pharm Biomed Anal.* 2006; 41: 1428–1432
37. Čizmić M, Ljubas D, Ćurković L, Škorić I, Babić S. Kinetics and degradation pathways of photolytic and photocatalytic oxidation of the anthelmintic drug praziquantel. *J Hazard Mater.* 2017; 323: 500–512
38. Suleiman MI, Akarim EI, Ibrahim KE, Saad AM, Mohammed AE, Ahmed BM *et al.* Antischistosomal effects of praziquantel, its alkaline hydrolysis and sun decomposed products on experimentally *S. mansoni* infected albino mice. (A) Efficacy assessment based on clinicopathological findings. *J Egypt Soc Parasitol.* 2004; 34(1): 131-42
39. Kezele Špehar T, Pocrnić M, Klarić D, Bertoša B, Čikoš A, Jug M, *et al.* Investigation of Praziquantel/Cyclodextrin Inclusion Complexation by NMR and LC-HRMS/MS: Mechanism, Solubility, Chemical Stability, and Degradation Products. *Mol Pharmaceut.* 2021; 18(11): 4210-4223
40. Stella, V J, He Q. Cyclodextrins. *Toxicol Pathol.* 2008; 36: 30–42
41. Jarho P, Velde D, Vander Stella VJ. Cyclodextrin-Catalyzed Deacetylation of Spironolactone Is PH and Cyclodextrin Dependent. *J Pharm Sci.* 2000; 89: 241–249

42. Rong L, Jon H, Hideji F, Miao X, Shu Y, Sheng D, *et al.* Analytical Characterization of Methyl- β -Cyclodextrin for Pharmacological Activity to Reduce Lysosomal Cholesterol Accumulation in Niemann-Pick Disease Type C1 Cells. *Assay Drug Dev Technol.* 2017; 15: 154-166
43. Perissutti B, Passerini N, Trastullo R, Keiser J, Zanolli D, Zingone G *et al.* An explorative analysis of process and formulation variables affecting comilling in a vibrational mill: The case of praziquantel, *Int J Pharm.* 2017; 533: 402-412
44. Šagud I, Zanolli D, Perissutti B, Passerini N, Škorić I. Identification of Degradation Products of Praziquantel during the Mechanochemical Activation. *J Pharm Biomed Anal* 2018; 159: 291-295
45. Albertini B, Perissutti B, Bertoni S, Zanolli D, Franceschinis E, Voinovich D, *et al.* Combining Mechanochemistry and Spray Congealing for New Praziquantel Pediatric Formulations in Schistosomiasis Treatment. *Int J Mol Sci.* 2019; 20: 1233
46. Bahl D, Bogner R.H. Amorphization of Indomethacin by Co-Grinding with Neusilin US2: Amorphization Kinetics, Physical Stability and Mechanism. *Pharm Res.* 2006; 23: 2317
47. Maleki A, Kettiger H, Schoubben A, Rosenholm JM, Ambrogi V, Hamidi M. Mesoporous silica materials: From physico-chemical properties to enhanced dissolution of poorly water-soluble drugs. *J Control Release.* 2017; 262: 329
48. Šagud I, Zanolli D, Zingone G, Perissutti B, Škorić I. Impact of mesoporous silica on the chemical degradation of Praziquantel upon grinding. *C R Chim.* 2021; 24: 233-242
49. Gaggero A, Jurišić Dukovski B, Radić I, Šagud I, Škorić I, Cinčić D, *et al.* Co-grinding with surfactants as a new approach to enhance in vitro dissolution of praziquantel. *J Pharm Biomed Anal.* 2020; 189: 113494
50. Sharkey WH, Mochel WE. Mechanism of the photooxidation of amides. *J Am Chem Soc.* 1959; 81: 3000-3005
51. Martin GE, Robins RH, Bowman PB, Duholke WK, Farley KA, Kaluzny BD, *et al.* Susceptibility of morpholine substituents to photo-oxidative decomposition identification of photo-oxidative degradants of linezolid *J Heterocycl Chem.* 1999; 36: 265-270
52. Mortelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res.* 2000; 455: Pages 29-60

ABECEDNI POPIS SKRAĆENICA

<i>kratica</i>	<i>značenje</i>
AI	acceptable intake (dozvoljeni unos)
ATR-FTIR	Attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy
AUC	Area under the ROC Curve
βCD	β-ciklodekstrin
BCS-II	Biopharmaceutics Classification System (Biofarmaceutski sustav klasifikacije)
CD	ciklodekstrin
CE	Complexation Efficiency (učinkovitost kompleksiranja)
CROSPVP	Crospovidone
DSC	Differential Scanning Calorimetry (Diferencijalna pretražna kalorimetrija)
FA	ferulinska kiselina
GA	galna kiselina
GC-MS	Gas chromatography–mass spectrometry (plinska kromatografija-masena spektrometrija)
HPβCD	2-hidrokspropil-β-ciklodekstrin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti)
IDR	Intrinsic Dissolution Rate (intrinzična brzina oslobađanja djelatne tvari iz lijeka)
IR	infrared (infracrveno)
LAG	Liquid Assisted Grinding (mljevenje uz dodatak otapala)
LC-HRMS	tekućinska kromatografija-spektrometrija masa
MCR	Multi-component Reactions (višekomponentne reakcije)
MEβCD	Metil-β-ciklodekstrin
MRT	srednje vrijeme zadržavanja
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
PA	protokatehuinska kiselina
Ph. Eur.	European Pharmacopoeia (Europska farmakopeja)
PMI	potential mutagenic impurity (potencijalno mutageno/kancerogeno onečišćenje)
PXRD	Powder X-ray diffraction (rentgenska difrakcija na prahu)
RMβCD	<i>randomly methylated</i> β-ciklodekstrin
R-PZQ	R-Prazikvantel; (11bR)-2-(cyclohexanecarbonyl)-3,6,7,11b-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-a]isoquinolin-4-one
SAD	Sjedinjene Američke države
SAR	Structure-Activity Relationship (odnos strukture i aktivnosti)
SBEβCD	natrijev sulfobutilete-β-ciklodekstrin
S-PZQ	S-Prazikvantel; (11bS)-2-(cyclohexanecarbonyl)-3,6,7,11b-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-a]isoquinolin-4-one
<i>t_{1/2}</i>	vrijeme polueliminacije
TGA	termalna gravimetrija
THF	tetrahidrofur
USP	United States Pharmacopoeia (Farmakopeja Sjedinjenih Američkih država)
VALAG	Variable Amount Liquid Assisted Grinding (mljevenje uz dodatak različitih količina otapala)
WHO	World Health Organization (Svjetska zdravstvena organizacija)
XRPD	X-Ray Powder Diffraction (difrakcija rendgenskih zraka)