

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

**ÇÖZÜNÜRLÜĞÜ VE ÇÖZÜNME HIZI ARTIRILMIŞ SELEKOKSİB  
FORMÜLASYONLARININ TASARIMI, OPTİMİZASYONU VE  
İN VİTRO/İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Ecz. Aslıhan ARSLAN**

**Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı  
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA  
2021**



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇÖZÜNÜRLÜĞÜ VE ÇÖZÜNME HIZI ARTIRILMIŞ SELEKOKSİB  
FORMÜLASYONLARININ TASARIMI, OPTİMİZASYONU VE  
İN VİTRO/İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Ecz. Aslıhan ARSLAN**

**Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı**

**DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Levent ÖNER**

**ANKARA**

**2021**

## YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ilişkin olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.<sup>(1)</sup>
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir.<sup>(2)</sup>
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir.<sup>(3)</sup>

07/12/2021

Ecz. Aslıhan ARSLAN

---

*“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”*

- (1) *Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*
- (2) *Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkânı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*
- (3) *Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir \*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan iş birliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.  
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir.*

**\* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.**

## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Prof. Dr. Levent ÖNER danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Ecz. Aslıhan ARSLAN

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım süresince bana hep özverili, yardımsever ve anlayışlı davranan; bilgisi, deneyimi, sahip olduğu bilimsel vizyon ile yolumu aydınlatan, özgür araştırmacı ruhumu canlı tutmamı sağlayan değerli danışman hocam Prof. Dr. Levent ÖNER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Akademik ve tüm bilimsel çalışmalarımındaki katkı ve destekleri için, her zaman yanımda olarak çözümler ürettiği için değerli hocam Prof. Dr. Hakan EROĞLU'na çok teşekkür ederim.

Bayes optimizasyonunun farmasötik teknoloji alanına uygulanması için bilgi ve deneyimiyle bana rehberlik eden, bu konudaki bilimsel katkı ve destekleri için Doç. Dr. Barbaros YET'e teşekkür ederim.

Biyoanalitik çalışmalardaki LC/MS-MS analizlerinin gerçekleştirilmesi ve analiz sonuçların yorumlanması aşamalarındaki bilimsel katkı ve destekleri için Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU'ya teşekkür ederim.

Tez izleme komitesinde yer alan hocalarım Prof. Dr. Selma ŞAHİN ve Doç. Dr. Mustafa Sinan KAYNAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımı gerçekleştirmem için her türlü imkânı sağladığı, zengin cihaz ve ekipman alt yapısını bizlerin kullanımına sunduğu, özgür ve huzurlu bir çalışma ortamı oluşturduğu için başta Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Levent ÖNER olmak üzere bölümümüzdeki tüm değerli öğretim üyesi/elemanı hocalarıma, araştırma görevlisi ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma, idari ve destek personellerine teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımı yürütmem için proje desteği sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) (Proje Kodu: 120S229) teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımı gerçekleştirmem için sunduğu esnek çalışma saatleri ve verdiği samimi destek için Elixir İlaç Araştırma ve Geliştirme AŞ Genel Müdürü Dr. Fırat YERLİKAYA'ya teşekkür ederim.

Her zaman olduğu gibi doktora sürecim boyunca da yanımda olan, yaşam enerjileri ile beni motive eden arkadaşlarıma çok teşekkür ediyorum.

Karşılıksız sevgi ve büyük bir sabırla her zaman yanımda olan, bana güç veren, bitmeyen çalışma isteğini bana da aşıl原因an babama, dünya güzeli gülüşü ve pozitif enerjisi ile bizleri hep mutlu eden anneme, bilgeliği ile yolumu aydınlatan ablama, renkli kişilikleri ile ailemizi şenlendiren küçük kardeşlerime çok teşekkür ederim.

## ÖZET

**Arslan, A., Çözünürlüğü ve Çözünme Hızı Artırılmış Selekoksib Formülasyonlarının Tasarımı, Optimizasyonu ve İn Vitro/İN Vivo Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı Doktora Tezi, Ankara, 2021.** Birlikte kuru öğütme, çözünürlüğü düşük etkin maddelerin çözünürlüğünü ve çözünme hızını iyileştirmek için son yıllarda yaygın bir şekilde kullanılan ve ilaç endüstrisinde uygulanabilir bir teknolojidir. Tasarımla kalite, önceden tanımlanmış hedeflerle, istatistiksel, analitik ve risk yönetimi metodolojisi kullanan sistematik bir yaklaşımdır. Bu tezin amacı, suda ve fizyolojik ortamlardaki çözünürlüğü düşük olan selekoksibin, birlikte kuru öğütme teknolojisi kullanılarak tasarımıyla kalite yaklaşımıyla mikronaltı/nano-boyutta bileşimlerini geliştirmek, bu bileşimleri *in vitro* ve *in vivo* olarak karakterize etmektedir. Ön tarama deneyleri ile birlikte kuru öğütme işleminde selekoksib için en uygun yardımcı maddeler belirlenmiştir. İşlem ve formülasyon etkenlerinin, birlikte öğütülmüş selekoksib bileşimlerinin kiritik kalite özellikleri üzerine etkilerini anlamak için farklı deney tasarımları kullanılmıştır. Ishikawa diagramı ile potansiyel risk faktörleri belirlenmiş, Plackett-Burman deney tasarımı ile önemli risk faktörleri seçilmiş, merkezi kompozit ve Bayes optimizasyonu ile selekoksib bileşimleri optimize edilmiştir. Optimize edilen birlikte öğütülmüş selekoksib bileşimleri, FTIR, XRD, DSC, SEM, IDR, çözünürlük ve stabilite çalışmaları ile karakterize edilmiştir. Bu bileşim ile geliştirilen optimum formülasyonun çözünme testleri, permeabilite çalışmaları ve sıçanlarda oral farmakokinetik çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, tasarımıyla kalite yaklaşımıyla mikronaltı/nano-boyutta, çözünürlüğü ve çözünme hızı artırılmış selekoksib bileşimlerinin tasarlanması için optimum parametreler belirlenmiştir. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalara ilişkin bulgular ile çözünürlüğü, çözünme hızı ve oral farmakokinetik profili iyileştirilmiş selekoksib bileşimlerinin geliştirildiği gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Selekoksib, kuru öğütme, merkezi kompozit, Bayes, intrinsik çözünme hızı.

**Destekleyen Kurum:** Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir (Proje Kodu: 120S229).

## ABSTRACT

**Arslan, A., Design, Optimization and In Vitro/In Vivo Evaluation of Celecoxib Formulations with Increased Solubility and Dissolution Rate, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, PhD. Thesis in Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, Ankara, 2021.** Dry co-milling is a technology that has been widely used in recent years and can be applied in the pharmaceutical industry to improve the solubility and dissolution rate of poorly soluble active substances. Quality by Design is a systematic approach that uses statistical, analytical and risk management methodology with predefined objectives. The aim of this thesis is to develop submicron/nano-sized compositions of celecoxib, which has low solubility in water and physiological environments, prepared by dry co-milling technology, with a quality by design approach and to characterize them *in vitro/in vivo*. The most suitable excipients for dry milling with celecoxib were determined by preliminary screening experiments. Different experimental designs were used to understand the effects of processing and formulation factors on the critical quality properties of co-milled celecoxib compositions. Potential risk factors were determined with Ishikawa diagram, important risk factors were selected with Plackett-Burman experimental design, and celecoxib compositions were optimized with central composite and Bayesian optimization. Optimized co-milled celecoxib compositions were characterized by FTIR, XRD, DSC, SEM, IDR, solubility and stability studies. Dissolution tests and permeability studies of the optimum formulation developed with this composition were carried out. Oral pharmacokinetic studies of the optimum formulation and reference product were performed in rats. As a result of these studies, optimum factors for the design of celecoxib compositions with increased solubility and dissolution rate at submicron/nano-sized were determined with the quality by design approach. Results of *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated the development of celecoxib compositions with improved solubility, dissolution rate, and oral pharmacokinetic profile.

**Keywords:** Celecoxib, dry milling, central composite, Bayesian, intrinsic dissolution rate.

**Supporting Institution:** This study was supported by The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBİTAK) (Project number: 120S229).



## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xiv
ŞEKİLLER	xvii
TABLolar	xxi
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>5</b>
2.1. Farmasötik Partikül Teknolojisi	5
2.1.1. Farmasötik Partikül Teknolojisi Genel Bilgiler	5
2.1.2. Jet ve Bilyalı Değirmenler	6
2.1.3. Yaş ve Kuru Öğütme ( <i>Wet and Dry Milling</i> )	10
2.1.4. Birlikte Kuru Öğütme ( <i>Dry Co-Milling</i> )	12
2.1.5. Birlikte Kuru Öğütme Yöntemi ile Hazırlanan Katı Dispersiyonlar	14
2.2. Tasarımla Kalite ( <i>Quality by Design, QbD</i> )	14
2.2.1. Deney Tasarımı ( <i>Design of Experiments, DoE</i> )	16
2.2.2. Plackett-Burman Deney Tasarımı	17
2.2.3. Merkezi Kompozit Deney Tasarımı ( <i>Central Composite Design, CCD</i> )	18
2.2.4. Bayes Optimizasyonu	21
2.3. Selekoksib	25
2.3.1. Selekoksibin Fizikokimyasal Özellikleri	25
2.3.2. Selekoksib Endikasyonu	26
2.3.3. Selekoksibin Farmakodinamik Özellikleri	26
2.3.4. Selekoksibin Farmakokinetik Özellikleri	26
2.3.5. Selekoksibin Çözünürlüğünü Arttırmak için Kullanılan Teknolojiler	27

2.3.6. Selekoksib Piyasa Preparatları	28
2.4. Çözünürlük ve İntrinsik Çözünme Hızı (IDR)	29
2.4.1. Çözünürlük	29
2.4.2. İntrinsik Çözünme Hızı	30
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>33</b>
3.1. Kullanılan Kimyasal ve Biyolojik Maddeler	33
3.2. Kullanılan Cihazlar ve Aletler	34
3.3. Kullanılan Yazılımlar	36
3.4. Deney Hayvanı	36
3.5. Selekoksibin Fizikokimyasal Karakterizasyon Çalışmaları	36
3.5.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)	36
3.5.2. Selekoksib Etkin Madde Miktar Tayini	37
3.5.3. X-Işını Difraksiyonu (XRD)	38
3.5.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)	38
3.5.5. Partikül Büyüklüğü Dağılımı (PSD)	39
3.6. Selekoksib Miktar Tayini Çalışmalarında Kullanılan Analitik Yöntem Validasyonu	39
3.6.1. Kromatografik Koşullar ve Sistem	40
3.6.2. Çözeltiler	40
3.6.3. Sistem Uygunluğu	42
3.6.4. Özgüllük	42
3.6.5. Doğrusallık ve Aralık	42
3.6.6. Doğruluk	42
3.6.7. Kesinlik	43
3.6.8. Duyarlılık	43
3.6.9. Stabilitate	43
3.6.10. Filtre Seçim Çalışması	43
3.7. Mikronaltı/Nano-boyutta Selekoksib Bileşimlerinin Hazırlanması	44
3.8. Ön Tarama Çalışmaları	45
3.9. Risk Faktörlerinin Belirlenmesi: Balık Kılçığı (Ishikawa) Diyagramı	46
3.10. Plackett-Burman Deney Tasarımı	47

3.11. Mikronaltı/Nano Boyutta Selekoksib Bileşimlerinin Optimizasyonu: Merkezi Kompozit ( <i>Central Composite</i> ) Deney Tasarımı	49
3.12. Mikronaltı/Nano-boyutta Selekoksib Bileşimlerinin Optimizasyonu: Bayes Optimizasyonu	52
3.13. Mikronaltı/Nano-boyutta Selekoksib Bileşimlerinin Karakterizasyonu	54
3.13.1. Çözünürlük	54
3.13.2. İntrinsik Çözünme Hızı	55
3.13.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)	58
3.13.4. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)	58
3.13.5. X-Işını Difraksiyonu (XRD)	59
3.13.6. Partikül Büyüklüğü	59
3.13.7. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)	60
3.13.8. Stabilitate Çalışmaları	60
3.14. Mikronaltı/Nano Boyutta Selekoksib Bileşimleri ile Formülasyon Çalışmaları	61
3.15. Selekoksib Formülasyonları Çözünme Çalışmaları	61
3.16. Selekoksib Formülasyonlarına İlişkin Hücre Kültürü Çalışmaları	62
3.16.1. Sitotoksisite Çalışmaları	63
3.16.2. Permeabilite Çalışmaları	64
3.17. Selekoksib Formülasyonlarına İlişkin Farmakokinetik Çalışmalar	65
<b>4. BULGULAR</b>	<b>69</b>
4.1. Selekoksibin Fizikokimyasal Karakterizasyon Çalışmaları	69
4.1.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)	69
4.1.2. Selekoksib Etkin Madde Miktar Tayini	71
4.1.3. X-Işını Difraksiyonu (XRD)	71
4.1.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)	72
4.1.5. Partikül Büyüklüğü Dağılımı (PSD)	73
4.2. Selekoksib Miktar Tayini Çalışmalarında Kullanılan Analitik Yöntemin Validasyonu	73
4.2.1. Sistem Uygunluğu	73
4.2.2. Özgüllük	74
4.2.3. Doğrusallık ve Aralık	75

4.2.4. Doğruluk	76
4.2.5. Kesinlik	77
4.2.6. Duyarlılık	78
4.2.7. Stabilité	78
4.2.8. Filtre Çalışması	79
4.3. Mikronaltı/Nano-boyutta Selekoksib Bileşimlerinin Hazırlanması: Ön Tarama Deneyleri	80
4.4. Risk Faktörlerinin Belirlenmesi: Ishikawa Diyagramı	84
4.5. Plackett-Burman Deney Tasarımı	85
4.6. Mikronaltı/Nano Boyutta Selekoksib Bileşimlerinin Optimizasyonu: Merkezi Kompozit ( <i>Central Composite</i> ) Deney Tasarımı	94
4.7. Mikronaltı/Nano-boyutta Selekoksib Bileşimlerinin Optimizasyonu: Bayes Optimizasyonu	104
4.8. Mikronaltı/Nano Boyutta Selekoksib Bileşimlerinin Karakterizasyonu	105
4.8.1. Çözünürlük	105
4.8.2. İntresik Çözünme Hızı	107
4.8.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)	112
4.8.4. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)	115
4.8.5. X-Işını Difraksiyonu (XRD)	118
4.8.6. Partikül Büyüklüğü	119
4.8.7. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)	121
4.8.8. Stabilité Çalışmaları	123
4.9. Mikronaltı/Nano Boyutta Selekoksib Bileşimleri ile Formülasyon Çalışmaları	124
4.10. Selekoksib Formülasyonları Çözünme Çalışmaları	126
4.11. Selekoksib Formülasyonlarına İlişkin Hücre Kültürü Çalışmaları	131
4.11.1. Sitotoksisite Çalışmaları	131
4.11.2. Permeabilite Çalışmaları	133
4.12. Selekoksib Formülasyonlarına İlişkin Farmakokinetik Çalışmalar	133
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>142</b>
5.1. Selekoksibin Fizikokimyasal Karakterizasyon Çalışmaları	142

5.2. Selekoksib Miktar Tayini Çalışmalarında Kullanılan Analitik Yöntemin Validasyonu	143
5.3. Mikronaltı/Nano-boyutta Selekoksib Bileşimlerinin Hazırlanması: Ön Tarama Deneyleri	145
5.4. Birlikte Öğütülmüş Selekoksib Bileşimlerinin Kritik Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi	148
5.5. Birlikte Öğütülmüş Selekoksib Bileşimleri için Kritik Formülasyon ve Üretim İşlem Parametrelerinin (Bağımsız Değişkenlerin) Seçilmesi, Risk Değerlendirmesinin Yapılması ve Optimizasyon Çalışmaları	148
5.6. Kritik Formülasyon ve Üretim İşlem Parametrelerinin (Bağımsız Değişkenlerin) Yanıt Değişkenler Üzerine Etkilerinin Değerlendirmesi	151
5.7. Mikronaltı/Nano-boyutta Selekoksib Bileşimlerinin Fizikokimyasal Özelliklerinin Değerlendirilmesi	156
5.8. Formülasyon ve Çözünme Çalışmalarının Değerlendirilmesi	161
5.9. Selekoksib Formülasyonlarına İlişkin Hücre Kültürü Çalışmalarının Değerlendirilmesi	162
5.10. Selekoksib Formülasyonlarına İlişkin Farmakokinetik Çalışmaların Değerlendirilmesi	164
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>167</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>170</b>
<b>8. EKLER</b>	
EK-1: Etik Kurul İzin Belgesi	
EK-2: Patent Bilgisi	
EK-3: Poster Bilgisi	
EK-4: Turnitin Dijital Makbuz	
EK-5: Tez Çalışması Orijinallik Raporu	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>ABD</b>	Amerika Birleşik Devletleri
<b>ANOVA</b>	Varyans Analizi
<b>AS</b>	Ankilozan Spondilit
<b>AUC</b>	Eğri Altında Kalan Alan
<b>BCS</b>	Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi
<b>BN</b>	Bağlı Nem
<b>BO</b>	Bayes Optimizasyonu
<b>CAS</b>	Kimyasal Kuramlar Servisi
<b>CB</b>	Güven Sınırı
<b>CCD</b>	Merkezi Kompozit Tasarım
<b>CE</b>	Çarpışma Enerjisi
<b>cGMP</b>	Güncel İyi İmalat Uygulamaları
<b>C<sub>maks</sub></b>	Maksimum Plazma Konsantrasyonu
<b>CMAs</b>	Kritik Materyal Özellikleri
<b>COX</b>	Siklooksijenaz
<b>CPPs</b>	Kritik İşlem Parametreleri
<b>CQAs</b>	Kritik Kalite Özellikleri
<b>DLS</b>	Dinamik Işık Saçılımı
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DMF</b>	Etkin Madde Ana Dosyası
<b>DMSO</b>	Dimetilsülfoksit
<b>DoE</b>	Deney Tasarımı
<b>DSC</b>	Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
<b>EDTA</b>	Etilendiamin Tetraasetik Asit
<b>EI</b>	Edinme Fonksiyonu
<b>EP</b>	Avrupa Farmakopesi
<b>FASSIF</b>	Açlık Durumu Yapay Bağırsak Sıvısı
<b>FBS</b>	Fetal Sığır Serumumu
<b>FCCD</b>	Yüz Merkezli Merkezi Kompozit Tasarım
<b>FDA</b>	Amerika Birleşik Devletleri İlaç ve Gıda Dairesi

<b>FTIR</b>	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi
<b>GP</b>	Gauss Süreci
<b>HEC</b>	Hidroksietil Selüloz
<b>HPLC</b>	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
<b>ICH</b>	Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu
<b>IDR</b>	İntrinsik Dissolüsyon Hızı
<b>LAC</b>	Laktoz Monohidrat
<b>LALLS</b>	Düşük Açılı Lazer Işık Saçılımı
<b>LHPC</b>	Düşük Sübstitüeli Hidroksipropil Selüloz
<b>LOD</b>	Teşhis Sınırı
<b>LOQ</b>	Tayin Sınırı
<b>MAN</b>	Mannitol
<b>MAS</b>	Magnezyum Aluminyum Silikat
<b>MRM</b>	Çoklu Reaksiyon İzleme
<b>MRT</b>	Ortalama Kalış Süresi
<b>MTT</b>	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
<b>NSAİİ</b>	Steroid Olmayan Antienflamatuar İlaç
<b>OA</b>	Osteoartrit
<b>OFAT</b>	Her Defasında Bir Faktör
<b>PAT</b>	Proses Analitik Teknoloji
<b>PBS</b>	Fosfat Buffer Saline
<b>PDI</b>	Polidispersite İndeksi
<b>ppm</b>	Milyonda bir birim
<b>PS40</b>	Polioksil 40 Stearat
<b>PSD</b>	Partikül Büyüklüğü Dağılımı
<b>PTFE</b>	Politetrafloroetilen
<b>PVP</b>	Polivinilpirolidon
<b>PVP-VA</b>	Vinil Prolidon ve Vinil Asetat Kopolimer
<b>QbD</b>	Tasarımla Kalite
<b>QTPP</b>	Kalite Hedefli Ürün Profili
<b>RA</b>	Romatoid Artrit
<b>RCCD</b>	Döndürülebilir Merkezi Kompozit Tasarım

<b>rpm</b>	Devir/dakika
<b>RSD</b>	Relatif Standart Sapma
<b>RSM</b>	Cevap Yüzey Metodolojisi
<b>SD</b>	Sprague Dawley
<b>SEDDS</b>	Kendiliğinden Emülsifiye olan İlaç Taşıyıcı Sistemler
<b>SEM</b>	Taramalı Elektron Mikroskopisi
<b>SLS</b>	Sodyum Lauril Sülfat
<b>SOL</b>	Soluplus
<b>SS</b>	Standart Sapma
<b>t<sub>1/2</sub></b>	Yarılanma Ömrü
<b>TEER</b>	Transepitelyal Elektrik Direnci
<b>t<sub>maks</sub></b>	Maksimum Plazma Konsantrasyonuna Ulaşmak İçin Geçen Süre
<b>USP</b>	Amerikan Farmakopesi
<b>XRD</b>	X-Işımı Difraksiyonu
<b>YSA</b>	Yapay Sinir Ağı



## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Farmasötik partikül teknolojilerinin şematik gösterimi.	6
2.2. Yukarıdan-aşağıya ve aşağıdan-yukarıya tekniklerinde elde edilen partikül büyüklüğü (nm) şematik gösterimi.	6
2.3. Air jet değirmen ve çalışma ilkesinin şematik gösterimi.	8
2.4. Yüksek enerjili değirmen tipleri.	8
2.5. Farklı materyallerden yapılmış bilyalı değirmen öğütme haznesi ve bilyalar.	9
2.6. Gezegen hareketli bilyalı değirmen ve çalışma ilkesinin şematik gösterimi.	9
2.7. Yüksek enerjili bilyalı değirmen ve çalışma ilkesinin şematik gösterimi.	10
2.8. Yaş öğütme şematik gösterimi ( <i>wet media milling</i> ).	11
2.9. Yaş öğütme sırasında gözlenebilecek kristal büyümesi mekanizmaların şematik gösterimi.	11
2.10. Minitab® 19 yazılımında oluşturulabilecek bir Plackett-Burman deney tasarım matris örneği.	17
2.11. Faktöriyel noktaları, merkez noktalarını ve yıldız/eksen noktalarını içeren CCD şematik gösterimi.	19
2.12. $\alpha$ düzeylerine ve değerlerine göre CCD tipleri.	20
2.13. Tek girdi ve tek çıktı değişkenine sahip BO işleminin değişik yineleme örnekleri: A:vekil model tahmin dağılımı ve öndeki gözlemler, B: edinme fonksiyonunun önerdiği yeni gözlem, C: güncellenen vekil model ile edinme fonksiyonunun önerdiği yeni gözlem gösterilmektedir.	23
2.14. Selekoksibin kimyasal yapısı.	25
2.15. Karışımın Gibbs serbest enerjisinin değişimi ve denge durumu şematik gösterimi.	30
3.1. Mikronaltı/Nano-boyutta selekoksib bileşimlerinin üretildiği gezegen hareketli bilyalı değirmen.	44
3.2. USP Wood aygıtı bileşenleri, örnek hazırlığı ve tutucu milin çözünme ortamındaki pozisyonu.	57
3.3. Sıçanlara oraj gavaj ile ilaç uygulaması (A) ve kuyruk veninden kan alım (B ve C) görselleri.	66
4.1. Selekoksib FTIR spektrumu.	70
4.2. Selekoksibin 500 µg/ml konsantrasyondaki çözeltisine ilişkin örnek kromatogram.	71

4.3.	İşlem görmemiş selekoksib Form-III etkin maddesine ilişkin X-ışını difraktogramı.	72
4.4.	İşlem görmemiş selekoksib etkin maddesine ilişkin DSC termogramı.	72
4.5.	İşlem görmemiş selekoksib etkin maddesine ilişkin PSD grafiği.	73
4.6.	Selekoksibin 200 µg/ml konsantrasyondaki standart çözeltisine ilişkin örnek kromatogram.	74
4.7.	Özgüllük çalışmasına ilişkin örnek kromatogramlar: a) test çözeltisi, b) standart çözelti, c) seyreltme çözeltisi, d) plasebo çözeltisi.	75
4.8.	Selekoksib miktar tayini yöntemine ilişkin regresyon doğrusu. y; pik alanını, x; selekoksib konsantrasyonunu göstermektedir.	76
4.9.	Ön tarama deneylerinde hazırlanan formülasyonlara ilişkin çözünmüş selekoksib miktarı (pH 12'de 60. dakikada) (mg) ve ortalama partikül büyüklüğü (nm) çubuk grafikleri.	81
4.10.	Selekoksib, F01, F03, F20 ve F21'e ilişkin XRD difraktogramları.	83
4.11.	Selekoksib ve F03'e ilişkin FTIR spektrumları.	83
4.12.	Birlikte öğütülmüş selekoksib bileşiminin kritik kalite özelliklerini etkileyebilecek formülasyon ve üretim işlem parametrelerini gösteren balık kılçığı (Ishikawa) diyagramı.	85
4.13.	Ortalama partikül büyüklüğü (Y <sub>1</sub> ) yanıt değişkeni için anlamlı bağımsız değişkenleri gösteren Pareto grafiği.	88
4.14.	Ortalama partikül büyüklüğü (Y <sub>1</sub> ) yanıt değişkeni için ana etki grafikleri.	89
4.15.	pH 12'de 30. dakikada çözünmüş selekoksib miktarı (mg) (Y <sub>2</sub> ) yanıt değişkeni için anlamlı bağımsız değişkenleri gösteren Pareto grafiği.	90
4.16.	pH 12'de 30. dakikada çözünmüş selekoksib miktarı (mg) yanıt değişkeni için ana etki grafikleri.	90
4.17.	pH 1,2+%0,2 SLS'de 120. dakikada çözünmüş selekoksib miktarı (mg) (Y <sub>3</sub> ) yanıt değişkeni için anlamlı bağımsız değişkenleri gösteren Pareto grafiği.	91
4.18.	pH 1,2+%0,2 SLS'de 120. dakikada çözünmüş selekoksib miktarı (mg) yanıt değişkeni için ana etki grafikleri.	92
4.19.	Sudaki çözünürlük (µg/mL) (Y <sub>4</sub> ) yanıt değişkeni için anlamlı bağımsız değişkenleri gösteren Pareto grafiği.	93
4.20.	Sudaki görünür çözünürlük (µg/mL) (Y <sub>4</sub> ) yanıt değişkeni için ana etki grafikleri.	93
4.21.	Modele ilişkin normal olasılık grafikleri: A; Y <sub>1</sub> yanıt değişkeni, B; Y <sub>2</sub> yanıt değişkeni.	98
4.22.	X <sub>1</sub> , X <sub>2</sub> ve X <sub>3</sub> bağımsız değişkenleri arasındaki etkileşimlerin Y <sub>1</sub> yanıt değişkeni üzerine etkisini gösteren kontur grafikleri.	99

- 4.23.  $X_1$ ,  $X_2$  ve  $X_3$  bağımsız değişkenleri arasındaki etkileşimlerin  $Y_1$  yanıt değişkeni üzerine etkisini gösteren üç boyutlu cevap yüzey grafikleri. 100
- 4.24.  $X_1$ ,  $X_2$  ve  $X_3$  bağımsız değişkenleri arasındaki etkileşimlerin  $Y_2$  yanıt değişkeni üzerine etkisini gösteren kontur grafikleri. 101
- 4.25.  $X_1$ ,  $X_2$  ve  $X_3$  bağımsız değişkenleri arasındaki etkileşimlerin  $Y_2$  yanıt değişkeni üzerine etkisini gösteren üç boyutlu cevap yüzeyi grafikleri. 102
- 4.26. Optimum birlikte öğütülmüş selekoksib bileşimi, fiziksel karışım, işlem görmemiş selekoksib etkin maddesi ve Celebrex® Kapsül çözünürlük sonuçlarına ilişkin karşılaştırmalı çubuk grafikleri. 106
- 4.27. İntrinsik çözünme hızı deneylerine ilişkin regresyon grafikleri ve denklemleri (A: pH 1,2+±0,2 SLS, B: pH 4,5+±0,2 SLS, C: pH 6,8+±0,2 SLS ve D: pH 12). 110
- 4.28. Karşılaştırmalı intrinsik çözünme hızı grafikleri (A: pH 1,2+±0,2 SLS, B: pH 4,5+±0,2 SLS, C: pH 6,8+±0,2 SLS, D: pH 12 (mg/500 mL). 111
- 4.29. FASSIF çözünme ortamında karşılaştırmalı intrinsik çözünme hızı grafiği (mg/500 mL). 112
- 4.30. Öğütme bileşiminde yer alan maddelerin DSC termogramları. 113
- 4.31. Farklı sıcaklık artışlarında optimum birlikte öğütülmüş selekoksib ve fiziksel karışıma ilişkin termogramlar. 114
- 4.32. FTIR spektrumları: a) selekoksib b) mannitol, c) polivinilpirolidon, d) sodyum lauril sülfat, e) optimum birlikte öğütülmüş selekoksib bileşimi ve f) optimum bileşime ilişkin fiziksel karışım. 116
- 4.33. Optimum birlikte öğütülmüş selekoksib ve fiziksel karışıma ilişkin karşılaştırmalı FTIR spektrumları. 117
- 4.34. X-ışını difraktogramları: a) selekoksib b) tek başına öğütülmüş selekoksib (F01), c) birlikte öğütülmüş selekoksib ve polivinilpirolidon (F03), d) optimum birlikte öğütülmüş selekoksib bileşimi (polivinilpirolidon>mannitol), e) birlikte öğütülmüş selekoksib, polivinilpirolidon, mannitol ve sodyum lauril sülfat (PB06) (polivinilpirolidon<mannitol) ve f) fiziksel karışım. 119
- 4.35. Seleksoksib, optimum birlikte öğütülmüş seleksoksib, fiziksel karışım ve Celebrex® Kapsül'e ilişkin partikül büyüklüğü ölçüm grafikleri. 120
- 4.36. SEM görüntüleri: (a) ve (b) işlem görmemiş seleksoksib. 121
- 4.37. Optimum birlikte öğütülmüş seleksoksibin X-Işını difraktogramları: (a) başlangıç (b), 40°C, %75 BN'de 3. ay, (c) 25°C, %60 BN'de 3. ay ve fiziksel karışımın X-Işını difraktogramları: (d) başlangıç. (e) 40°C, %75 BN'de 3. ay, (f) 25°C, %60 BN'de 3. ay. 124
- 4.38. Optimum formülasyon ve Celebrex® Kapsül çözünme profilleri: sink koşul: A: pH 1,2+±0,2; B: pH 4,5+±0,2; C: pH 6,8+±0,2; sink olmayan koşul: D: pH 1,2+±0,2. 129

- 4.39. Sitotoksisite çalışması % hücre canlılığı karşılaştırmalı grafikleri; A: 1  $\mu$ M-1000  $\mu$ M aralığındaki konsantrasyonların % hücre canlılığı, B: 1  $\mu$ M-50  $\mu$ M aralığındaki konsantrasyonların % hücre canlılığı. 132
- 4.40. LC-MS/MS yöntemi ile yapılan selekoksib miktar tayinine ilişkin örnek kromatogram: a) standart çözelti, b) plazma. 134
- 4.41. Plazmadan selekoksib miktar tayini yöntemine ilişkin regresyon doğrusu. y pik alanını, x selekoksib konsantrasyonunu göstermektedir. 134
- 4.42. Oral yoldan 10 mg/kg uygulama sonrası her bir sıçan için zamana karşı plazma selekoksib konsantrasyonu grafikleri. 137
- 4.43. Oral yoldan 40 mg/kg uygulama sonrası her bir sıçan için zamana karşı plazma selekoksib konsantrasyonu grafikleri. 138
- 4.44. Optimum formülasyon ve Celebrex® Kapsül karşılaştırmalı plazma konsantrasyonu-zaman grafikleri: A:10 mg/kg, B: 40 mg/kg. 140
- 4.45. 10 mg/kg ve 40 mg/kg dozlara ilişkin karşılaştırmalı plazma konsantrasyonu-zaman grafikleri. 141

## TABLOLAR

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
2.1. Plackett-Burman deney tasarım matrisi.	18
3.1. Selekoksib etkin madde miktar tayini analizi kromatografik koşullar.	37
3.2. Selekoksib partikül büyüklüğü dağılımı analiz yöntemi.	39
3.3. Selekoksib etkin madde miktar tayini yöntemi için kromatografik koşullar.	40
3.4. Ön tarama deneylerinde kullanılan yardımcı maddeler ve selekoksib:yardımcı madde ağırlık oranları.	46
3.5. Plackett-Burman deney tasarımında kullanılan değişkenler ve düzeyleri.	48
3.6. Plackett-Burman deney tasarım matrisi.	49
3.7. Merkezi Kompozit deney tasarımında kullanılan değişkenler ve düzeyleri.	50
3.8. Merkezi kompozit deney tasarımında sabit düzeyde kullanılan değişkenler.	50
3.9. Merkezi kompozit deney tasarım matrisi.	51
3.10. Gauss Süreci ( <i>Gauss Process</i> -GP) vekil modelini başlatma deneyleri.	53
3.11. BO tarafından önerilen kümülatif deney tasarım matrisi.	54
3.12. İntrinsik çözünme hızı deney koşulları.	57
3.13. Hızlandırılmış koşul ve uzun dönem koşuluyla ilişkin stabilite deney planı.	60
3.14. Optimum formülasyon ve referans ürünün oral farmakokinetik çalışmasına ilişkin deney tasarımı.	66
3.15. Selekoksib miktar tayini yöntemine ilişkin kromatografik koşullar.	68
3.16. Selekoksib miktar tayini yöntemine ilişkin MS/MS dedeksiyon koşulları.	68
4.1. Selekoksib FTIR spektrumu üretici firma ve deneysel analiz sonuçları.	69
4.2. Selekoksib etkin madde miktar tayini (%) sonuçları.	71
4.3. Selekoksib sistem uygunluğu verileri.	74
4.4. 7 farklı konsantrasyonda hazırlanan çözelti alanları.	76
4.5. Doğruluk parametresi % geri kazanım sonuçları.	77
4.6. Birinci gün elde edilen selekoksib miktar tayini kesinlik sonuçları (tekrarlanabilirlik).	77
4.7. İkinci gün elde edilen selekoksib miktar tayini kesinlik sonuçları (ara kesinlik).	78
4.8. İki gün boyunca elde edilen kesinlik sonuçları.	78

4.9.	Selekoksisib çözeltilerinin stabilitesine ilişkin analiz sonuçları.	79
4.10.	Selekoksisib çözeltilerinin filtre çalışmasına ilişkin analiz sonuçları.	79
4.11.	Ön tarama deneylerinde hazırlanan formülasyonlara ilişkin çözünmüş selekoksisib miktarı (pH 12'de 60. dakikada) ve ortalama partikül büyüklüğü sonuçları.	82
4.12.	Ön tarama deneylerinde hazırlanan formülasyonlara ve selekoksibe ilişkin çözünmüş selekoksisib miktarı (pH 1,2+±0,2 SLS'de 120. dakikada).	84
4.13.	Plackett-Burman deney tasarımı ile elde edilen yanıt değişken değerleri.	86
4.14.	Plackett-Burman deney tasarımı ile elde edilen bağımlı değişken değerlerinin istatistiksel analizi.	87
4.15.	Merkezi kompozit deney tasarımı ile elde edilen yanıt değişken değerleri.	95
4.16.	İkinci dereceden/kuadratik modeldeki $Y_1$ ve $Y_2$ yanıt değişkenleri için varyans analizinin (ANOVA) özeti.	96
4.17.	Arzu edirlilik fonksiyonuna dayalı optimum birlikte öğütülmüş selekoksisib formülasyonuna ilişkin deneysel ve öngörülen sonuçları.	104
4.18.	BO tarafından önerilen deney tasarımına ilişkin analiz sonuçları.	105
4.19.	Optimum birlikte öğütülmüş selekoksisib bileşimi, fiziksel karışım, işlem görmemiş selekoksisib etkin maddesi ve Celebrex® Kapsül çözünürlük sonuçları ( $\mu\text{g/mL}$ ).	106
4.20.	500 mL pH 1,2+±0,2 SLS çözünme ortamında çözünmüş selekoksisib miktarı (mg).	108
4.21.	500 mL pH 4,5+±0,2 SLS çözünme ortamında çözünmüş selekoksisib miktarı (mg).	108
4.22.	500 mL pH 6,8+±0,2 SLS çözünme ortamında çözünmüş selekoksisib miktarı (mg).	108
4.23.	500 mL pH 12 çözünme ortamında çözünmüş selekoksisib miktarı (mg).	109
4.24.	500 mL FASSIF çözünme ortamında çözünmüş selekoksisib miktarı (mg).	109
4.25.	pH 1,2+±0,2 SLS, pH 4,5+±0,2 SLS, pH 6,8+±0,2 SLS ve pH 12'de selekoksisibin intrinsik çözünme hızı ( $\text{mg/dk/cm}^2$ ).	109
4.26.	Optimum birlikte öğütülmüş selekoksisib ve fiziksel karışıma ilişkin 3 aylık stabilite analiz sonuçları.	123
4.27.	Celebrex® Kapsül kalitatif ve kantitatif bileşim.	125
4.28.	Celebrex® Kapsül karakterizasyon çalışma sonuçları.	125
4.29.	Selekoksisib 200 mg kapsül kalitatif ve kantitatif bileşim.	126

- 4.30.** Optimum formülasyon (37 mg selekoksib/1000 mL) ve Celebrex® Kapsül (19 mg selekoksib/1000 mL) sink koşulun sağlandığı çözünme testi sonuçları (% çözünen). 127
- 4.31.** Optimum formülasyon (200 mg selekoksib/1000 mL) ve Celebrex® Kapsül (200 mg selekoksib/1000 mL) sink koşulun sağlanmadığı çözünme testi sonuçları (% çözünen). 128
- 4.32.** Optimum formülasyon ve referans ürüne ilişkin benzerlik faktörü (f2) değerleri tablosu. 128
- 4.33.** Selekoksib, optimum birlikte öğütülmüş selekoksib, fiziksel karışım ve Celebrex® Kapsül'e ilişkin sitotoksosite sonuçları. 132
- 4.34.** Apikalden bazolaterale geçiş yönünde ortalama selekoksib P<sub>app</sub> değerleri. 133
- 4.35.** 10 mg/kg dozda uygulanan Celebrex® Kapsül ürünü için plazma selekoksib konsantrasyonları. 135
- 4.36.** 10 mg/kg dozda uygulanan optimum formülasyon için plazma selekoksib konsantrasyonları. 135
- 4.37.** 40 mg/kg dozda uygulanan Celebrex® Kapsül ürünü için plazma selekoksib konsantrasyonları. 136
- 4.38.** 40 mg/kg dozda uygulanan optimum formülasyon için plazma selekoksib konsantrasyonları. 136
- 4.39.** Oral uygulama sonrası optimum formülasyon ve Celebrex® Kapsül'e ilişkin farmakokinetik parametreler. 139

## 1. GİRİŞ

Steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ), çeşitli hastalıkların tedavisinde ve semptomlarının azaltılmasında dünya genelinde en sık reçetelenen ilaç grubudur. NSAİİ'ler osteoartrit (OA), romatoid artrit (RA), ankilozan spondilit (AS) gibi hastalıklarda eklem iltihabı nedeniyle gözlenen ağrı ve sertliğin azaltılmasını sağlayan ilaçlardır (1, 2).

Artrit dünya genelinde görülme sıklığı yüksek, tahmin edilen oranlardan daha yüksek insidansa sahip bir hastalıktır. 2015 yılında Amerika'da 54,4 milyon insana artrit tanısı konulmuştur ve 2040 yılında bu rakamın 78 milyon olacağı tahmin edilmektedir (3). 2016 verilerine göre romatoid artrit, dünya genelinde 17,6 milyon insanı etkilemiştir. Amerika'da 1,6 milyondan fazla insan, Avrupa'da ise 6,2 milyon insan romatoid artrit hastasıdır (4). Benzer şekilde Amerika'da 30 milyondan fazla kişide osteoartrit görülmekte, dünya genelinde ise yaklaşık olarak 242 milyon osteoartrit hastası bulunmaktadır (5). Ankilozan spondilitin görülme sıklığı, romatoid artrit ve osteoartrite göre daha az olmakla birlikte, hastaların sahip olduğu şiddetli ağrı ve sertlik nedeniyle NSAİİ'lere olan gereksinimleri oldukça fazladır.

Diklofenak, indometazin, ibuprofen, naproksen, meloksikam ve selekoksib gibi NSAİİ'ler osteoartrit, romatoid artrit, ankilozan spondilit gibi hastalıkların tedavisinde ülkemizde ve dünya genelinde en sık kullanılan ilaçlardır (2). NSAİİ'ler genel olarak semptomatik tedavi sağlamak için kullanılmasına rağmen osteoartrit, romatoid artrit, ankilozan spondilit gibi kronik hastalıkların tedavisinde sürekli olarak kullanıldığında; toksisiteyi arttırmadan radyolojik ilerlemeyi azaltmaktadır. Bu nedenle hastaların, sadece ağrı hissettiklerinde belirti ve semptomlarını azaltmak amacıyla değil, sürekli olarak NSAİİ almaları gerekmektedir (6). NSAİİ'lerin faydalarının yanı sıra gastrointestinal, kardiyovasküler ve renal yan etkileri bulunmaktadır. Hastaların NSAİİ'lerden fayda sağlarken çok fazla yan etki ile karşılaşmaması için Amerika Birleşik Devletleri İlaç ve Gıda Dairesi (FDA), tüm NSAİİ'ler ile yapılan tedavilerde hedefe uygun en kısa süreli, en düşük etkili dozda ilaç kullanılmasını önermektedir (7).



Son yıllarda yapılan çalışmalarda, özellikle osteoartrit, romatoid artrit ve ankilozan spondilit tedavisinde sürekli olarak kullanılan NSAİİ'lerin etkili en düşük dozda kullanılmasını sağlamak, dolayısı ile yan etkilerini azaltmak için ilaçların farmakokinetik özelliklerinin iyileştirilmesi hedeflenmiştir (8).

Farmasötik partikül teknolojisi, sudaki çözünürlüğü düşük olan etkin maddelerin çözünürlüğünü, çözünme hızını ve biyoyararlanımını artırmak için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Yaş öğütme yöntemi ile hazırlanan ve başarılı sonuçlar elde edilerek ticari ürüne dönüşen birçok formülasyon bulunmaktadır (9). Yaş öğütme ile karşılaştırıldığında daha az işlem basamağı içermesi, endüstriye kolay uygulanabilir olması nedeniyle kuru öğütme işlemi tercih edilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde, diklofenak, indometazin, meloksikam moleküllerinin kuru öğütme yöntemi ile çözünürlüğü, çözünme hızı dolayısı ile biyoyararlanımı artırılmış, bu ürünler daha düşük yitiliklerde FDA tarafından ruhsatlandırılmıştır (7, 10, 11). Tasarlanan yeni formülasyonların klinik çalışma sonuçları, iyileştirilmiş farmakokinetik profili ile daha düşük yitilikte uygulamanın mümkün olduğunu göstermiştir. SoluMatrix Fine Particle Technology™ olarak isimlendirilen birlikte kuru öğütme yöntemi ile farklı etkin maddelerin biyoyararlanımının artırılması için yapılan çalışmalar devam etmektedir (12).

Selekoksib, osteoartrit, romatoid artrit ve ankilozan spondilit gibi hastalıkların belirti ve semptomlarının tedavisinde, selektif siklooksijenaz-2 (COX-2) inhibitörü olarak kullanılan bir NSAİİ'dir (13). Yapılan çalışmalar, bu hastalıkların tedavisinde selekoksibin tümör nekroz faktörü inhibitörleri ile kombine kullanımı sonucu radyolojik iyileşmelerin olduğunu göstermektedir (14). Diğer NSAİİ'ler gibi selekoksibin de istenmeyen etkileri bulunmaktadır. İlaç piyasasında selekoksibin yan etkilerini azaltmayı sağlayacak, daha düşük yitilikte üretilmesine ve kullanılmasına imkân verecek bir ürün henüz bulunmamaktadır. Seleksoksib, Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi'ne (BCS) göre Sınıf 2 bir ilaçtır; absorpsiyon hızında hız kısıtlayıcı basamak çözünme hızıdır, dolayısıyla selekoksibin çözünürlük ve çözünme hızı gibi özelliklerinin artırılması ile farmakokinetik özellikleri iyileştirilebilir.

Selekoksibin klinik etkilerini araştırmak için yapılan çalışmalar, osteoartrit, romatoid artrit ve ankilozan spondilit gibi hastalıkların semptomatik tedavisindeki etkinliğinin yanı sıra farklı hastalıklarda da etkili olabileceğini göstermektedir (15,

16). Selekoksib, araştırılmaya ve klinik etkileri aydınlatılmaya gereksinimi olan bir ilaçtır. Aynı zamanda selekoksibin, amlodipin ile sabit doz kombinasyonunun, tromadol ile ko-kristal şeklinin yeni ruhsatlandırılan ürünler olması, selekoksibin farklı etkin maddeler ile kombine edilme potansiyelinin yüksek olduğunu göstermektedir (17, 18).

Tasarımla kalite, önceden tanımlanmış hedeflerle ilaçların tasarımında, geliştirilmesinde ve üretilmesinde istatistiksel ve analitik yöntemler ile risk yönetimi kullanarak ilaç kalitesini sağlayan sistematik bir yaklaşımdır (19, 20). Bu yaklaşımın uygulanabilmesi için farklı deney tasarımları kullanılabilir. Geleneksel deney tasarımlarında aynı anda tek etken değiştirilebildiği için daha fazla sayıda deney yapılması gerekmekte, etkenler arası etkileşim saptanamamaktadır. Bu nedenle çok sayıda etkenin etkisinin incelenebilmesi için birinci ve ikinci dereceden matematiksel modeller sunan deney tasarımları kullanılmaktadır (21, 22).

Faktöriyel tasarımlarda etkenlerin etkisi bilinmiyorsa, öncelikle tarama deneyleri yapılmaktadır. Kesirli faktöriyel veya Plackett-Burman gibi tasarımlar ile etkenlerin etkisi tanımlanmaktadır. Daha sonra ise faktörlerin etkisinin istatistiksel olarak tanımlanabilmesi için ikinci dereceden cevap yüzey deney tasarımları kullanılmaktadır (21, 22). Bu tasarımlara ek olarak henüz farmasötik teknoloji alanında yaygın bir kullanımı olmayan Bayes optimizasyonu (BO), sürekli öğrenen ve daha az sayıda deneysel çalışma ile hedefe ulaşılmasını sağlayabilecek bir deney tasarımıdır (23).

Yeni bir ilacın piyasaya sunulması sürecinde, klinik öncesi dönemde (preklinik faz), aday maddelerin fizikokimyasal özellikleri *in vitro* testler ve farmakokinetik özellikleri *in vivo* hayvan deneyleri ile araştırılmakta, belirlenmektedir. Yeni geliştirilen formülasyonların da benzer şekilde, öncelikle *in vitro* testler ile fizikokimyasal karakterizasyonu yapılmakta, ardından hücre kültürü çalışmaları ile sitotoksitesisi, permeabilitesi araştırılmakta ve en uygun formülasyon kullanılarak farmakodinamik ve farmakokinetik özelliklerin belirlenebilmesi için hayvan deneyleri yapılmaktadır.

Bu tezin amacı, selekoksibin çözünürlüğünün ve çözünme hızının arttırılması için birlikte kuru öğütme yöntemi kullanılarak yeni bir ürün geliştirilmesidir. Bu süreçte tasarımla kalite yaklaşımı uygulanması hedeflenmiştir. Bu amaçla;

- Selekoksinin birlikte öğütülebileceği en uygun yardımcı maddelerin seçimi için ön tarama deneyleri yapılmıştır.
- Selekoksinin, *in vitro* testlerdeki miktar tayininin belirlenebilmesi için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi geliştirilerek yöntem validasyonu yapılmıştır.
- Birlikte kuru öğütme işleminin ve öğütme bileşiminde yer alan yardımcı maddelerin selekoksin bileşimlerinin kritik kalite özellikleri üzerindeki etkisini belirlemek için ilk olarak Plackett-Burman deney tasarımı ile tarama deneyleri yapılmıştır. Etkili formülasyon bileşenlerinin etkisini matematiksel bir model ile değerlendirmek ve formülasyonu optimize etmek için merkezi kompozit deney tasarımı kullanılmıştır. Aynı zamanda merkezi kompozit deney tasarımına göre daha az deney ile optimum selekoksin bileşimi elde edebilmek için Bayes optimizasyon deney tasarımı uygulanmıştır.
- Birlikte öğütülmüş optimum selekoksin bileşimlerinin fizikokimyasal özelliklerini belirlemek için çalışmalar yapılmış, bu bileşim ile kapsül formülasyonu geliştirilmiş ve *in vitro* çözünme testleri yapılmıştır. Optimum formülasyonun permeabilitesini belirleyebilmek için *in vitro* hücre kültürü çalışmaları yürütülmüştür. Farmakokinetik özelliklerinin belirlenmesi için formülasyonlar, sıçanlara oral yoldan uygulanmış, belirli zaman aralıklarında kan örnekleri alınarak analiz edilmiş, istatistiksel hesaplamalar sonucunda formülasyonlara ilişkin farmakokinetik parametreler belirlenmiştir.

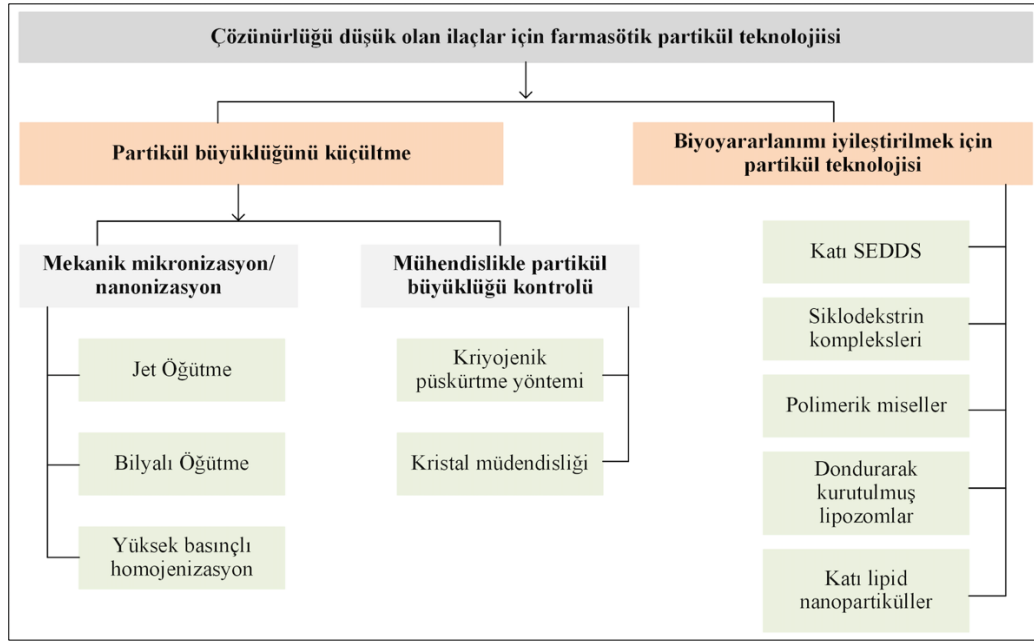
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Farmasötik Partikül Teknolojisi

#### 2.1.1. Farmasötik Partikül Teknolojisi Genel Bilgiler

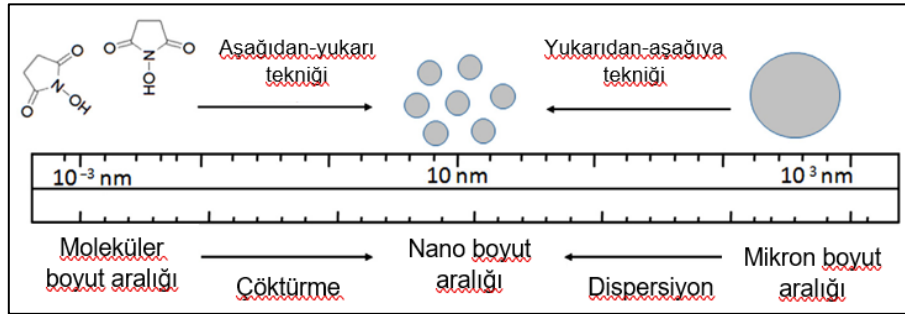
İlaç etkin maddeleri, BCS'ye göre çözünürlük ve geçirgenlik (permeabilite) özellikleri esas alınarak dört grupta sınıflandırılır (24, 25). Çözünürlük, çözünme ve permeabilite; ilaç absorpsiyon hızını, derecesini ve dolayısı ile biyoyarlanımı kontrol eden temel özelliklerdir (24, 26). Etkin maddelerin çözünme hızı absorpsiyon hızından daha yavaş olduğu durumlarda, ilaçların mide-bağırsak kanalından absorpsiyon hızı; çözünme hızı ile kontrol edilir (25, 27-29). Biyoyarlanımı düşük olan etkin maddelerin çözünürlük ve çözünme hızının artırılması amacıyla uygulanan çok sayıda teknik ve yaklaşım bulunmaktadır (30, 31). Bu yaklaşımlardan farmasötik partikül teknolojisi; çözünürlüğü düşük olan etkin maddelerin fizikokimyasal, mikromeritik ve biyofarmasötik özelliklerini değiştirerek çözünürlüğünü arttırmak amacıyla kullanılan bir teknolojidir (29). Çözünürlüğü arttırmak için yaygın olarak kullanılan yaklaşımlar, sıvıyla temas eden yüzey alanını arttırmak için partikül büyüklüğünü küçültmek veya kristal şeklini değiştirmek gibi fiziksel değişiklik uygulama teknikleridir (29-33).

Partikül büyüklüğü küçültme yöntemleri, mekanik olarak uygulanan yöntemler ve mühendislik ile partikül büyüklüğünün kontrol edildiği yöntemler olarak iki alt grupta incelenmektedir. Mekanik olarak partikül büyüklüğünün küçültülmesi işlemi (mikronizasyon/nanonizasyon); jet değirmenler, bilyalı değirmenlerde (yüksek enerjili, gezegen hareketli) yapılmasına ek olarak yüksek basınçlı homojenizasyon teknikleri ile de uygulanmaktadır. Mühendislik ile partikül büyüklüğünün kontrol edildiği yöntemler ise kriyojenik püskürtme yöntemi (çok düşük sıcaklıklarda porozite derecesi yüksek olan nano yapılı amorf ilaç partiküllerinin oluşturulması), kristal mühendisliği (kontrollü kristalizasyon işlemi ile metastabil polimorf, yüksek enerjili amorf formlar, çok ince partiküller elde edilmesi) olarak isimlendirilen yöntemlerdir (29). Biyoyarlanımı arttırmak amacıyla kullanılan diğer partikül teknolojileri; katı kendiliğinden emülsifiye olan ilaç taşıyıcı sistemler (SEDDS), siklodekstrin kompleksleri, polimerik miseller, dondurarak kurutulmuş lipozomlar ve katı lipid nanopartiküllerdir (Şekil 2.1.).



**Şekil 2.1.** Farmasötik partikül teknolojilerinin şematik gösterimi [(29) numaralı kaynaktan hareketle yeniden düzenlenmiştir].

Bahsedilen yöntemlerden mekanik olarak partikül büyüklüğünün küçültülmesi yöntemi, mikron boyutundaki partiküllerin bir mekanik işlem sonucu mikron altı ve/veya nano-boyuta küçültülmesinden dolayı yukarıdan-aşağıya tekniği (*top-down technique*) olarak isimlendirilmektedir (9, 31, 34) (Şekil 2.2.).



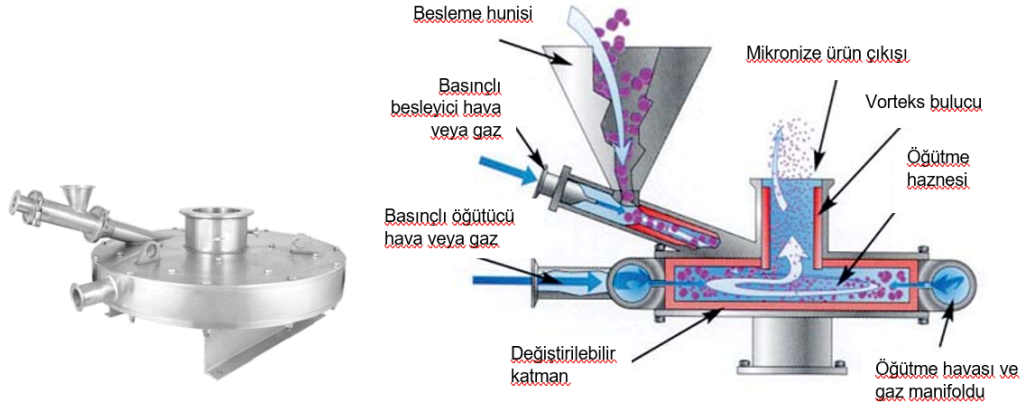
**Şekil 2.2.** Yukarıdan-aşağıya ve aşağıdan-yukarıya tekniklerinde elde edilen partikül büyüklüğü (nm) şematik gösterimi [(30) numaralı kaynaktan hareketle yeniden düzenlenmiştir].

### 2.1.2. Jet ve Bilyalı Değirmenler

Özellikle katı dozaj şekillerinin üretilmesi açısından endüstride yaygın olarak uygulanan farmasötik partikül teknolojisi, farklı çalışma ilkelerine sahip olan jet değirmenler ve bilyalı değirmenler (yüksek enerjili, gezegen hareketli, attritor tipi) ile mekanik olarak partikül büyüklüğünün küçültülmesi tekniğidir (9, 29, 35). Jet

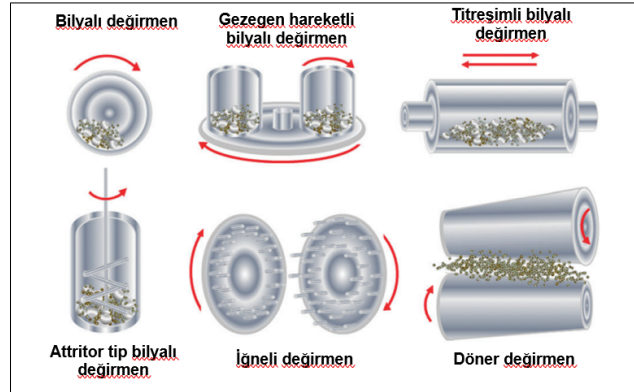
değirmenler sadece kuru yöntemle partikül büyüklüğünün küçültülmesini sağlarken, bilyalı değirmenler ile kuru (*dry*) ve yaş öğütme (*wet*) yapılabilir. Yüksek basınçlı homojenizatör ile sadece yaş öğütme yapılması mümkündür ve nanosüspansiyonlar üretilebilir (30, 35-38).

Jet değirmenler, yüksek basınçlı akışkan enerjisi ile çalışır, jet değirmen gövdesine çok yüksek basınçlarda hava verilmesi sonucu, hizalanmış jetler öğütme haznesi içerisinde bir girdap oluşturur ve bu sayede partiküller birbirine ve değirmen gövdesine çarpmaya başlar. Öğütme haznesi içerisinde oluşan yüksek hızlı dönüş, partiküllerin birbirine ve çeperlere sürekli olarak çarpmasını sağlar, bu şekilde daha küçük partikül boyutları elde edilir. Oluşan merkezkaç kuvveti büyük partikülleri öğütme haznesinin çeperine doğru iterken küçülen partiküller girdabın etkisi ile merkeze doğru hareket eder ve tüm partiküller homojen bir şekilde mekanik etkiye maruz kalır (Şekil 2.3.). Jet değirmenler, ek bir ekipmana (bilya) gerek olmadan sadece kuru öğütme yapılmasını sağlamakta, etkin maddelerin kontaminasyon riskini azaltmaktadır, aynı zamanda ısıya duyarlı etkin maddeler için uygun bir tekniktir (9, 29). Literatürde ibuprofen, salbutamol sülfat, fenoterol hidrobromür, silostazol etkin maddelerinin çözünürlüğünü ve çözünme hızını iyileştirmek amacıyla jet değirmen kullanılmıştır (9, 39). Jet değirmenler ile 100 µm başlangıç boyutundan 3-5 µm ortalama partikül büyüklüğüne inmek mümkün olabilmektedir. Ancak partiküllerin en küçük 3-5 µm boyuta kadar düşürülebilmesi, her etkin maddenin çözünürlüğünü ve çözünme hızını arttırmak için hedeflenen bir boyut olmamaktadır ve bazı etkin maddelerin kuru yöntemle öğütülmesi sonucu başarılı sonuçlar alınamamaktadır. Tüm bu nedenlerden dolayı ilaç endüstrisinde çözünürlüğü arttırmak amacıyla jet değirmenlerin kullanım sıklığı, yüksek enerjili değirmenlerin gerisinde kalmıştır (9).



**Şekil 2.3.** Air jet değirmen ve çalışma ilkesinin şematik gösterimi [(40) numaralı kaynaktan hareketle yeniden düzenlenmiştir].

Yüksek enerjili değirmen olarak kullanılan farklı değirmen tipleri bulunmaktadır (Şekil 2.4.). Bunlardan ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılanlar gezegen hareketli bilyalı değirmen, yüksek enerjili bilyalı değirmen ve attritor tipi bilyalı değirmenlerdir.



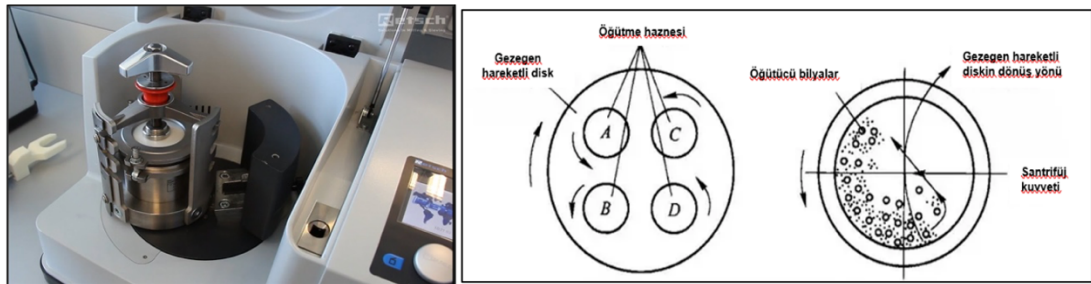
**Şekil 2.4.** Yüksek enerjili değirmen tipleri [(41) numaralı kaynaktan hareketle yeniden düzenlenmiştir].

Bilyalı değirmenler, jet değirmenlerden farklı olarak öğütme haznesi içerisinde yer alan bilyalar ile partiküllerin mekanik etki ile küçülmesini sağlar. İlaç endüstrisine ek olarak birçok endüstriyel alanda uygulanabilir olması ve uygun maliyetli bir teknik olması sonucu tüm dünyada oldukça geniş bir uygulama alanına sahiptir (37). Bilyalı değirmenlerde öğütme haznesi ve bilyalar ile ilaç etkin maddelerinin etkileşimini en aza indirmek amacıyla çelik, seramik, zirkonyum, agat gibi farklı materyallerden yapılmış hazne ve bilyalar bulunmaktadır (Şekil 2.5.) (29, 30, 32).



**Şekil 2.5.** Farklı materyallerden yapılmış bilyalı değirmen öğütme haznesi ve bilyalar: gri: paslanmaz çelik, beyaz: seramik, koyu gri: agat (42).

Gezegen hareketli bilyalı değirmen, yüksek enerjili bilyalı değirmen ve attritor tipi bilyalı değirmenlerin ana çalışma ilkeleri esasta benzer olmasına rağmen, çalışma mekanizmaları arasında farklılıklar bulunmaktadır. Gezegen hareketli bilyalı değirmende öğütme haznesi bir tabla üzerinde konumlanmıştır. Tabla hareket yönünde 1 birim döndüğünde, bilyaların ve numunenin olduğu hazne, ters yönde 2 birim döner. Hazne içindeki bilyalar, bindirilmiş dönme hareketine maruz kalır. Hazne içinde öğütme bilyaları, dönme hareketlerini *Coriolis* kuvvetine<sup>1</sup> maruz kalarak gerçekleştirir. Bilyalar ve hazne hızları arasındaki yüksek enerji, sürtünme ve darbe kuvvetleri üretir. Bu kuvvetler arasındaki etkileşim, gezegen hareketli bilyalı değirmenin partiküllerin çok ince partiküllere dönüşmesini sağlar (Şekil 2.6.).



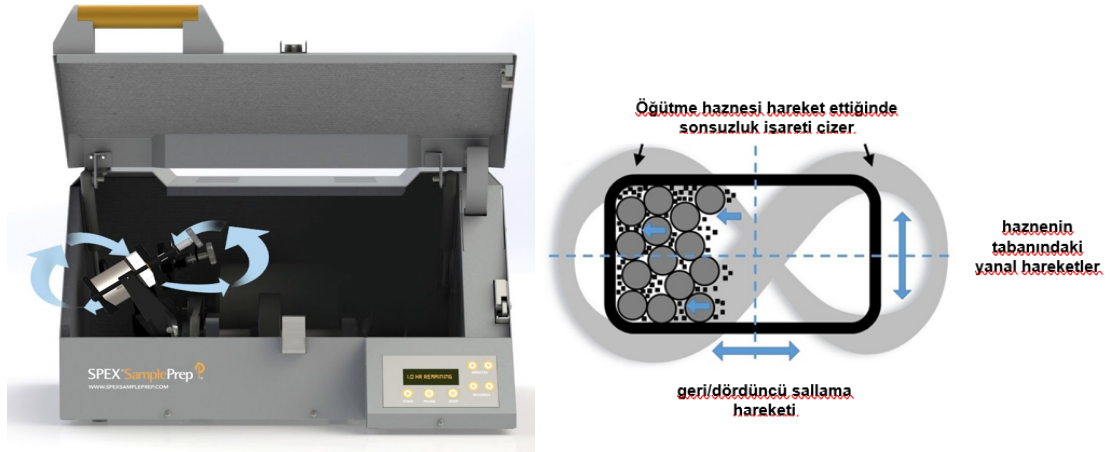
**Şekil 2.6.** Gezegen hareketli bilyalı değirmen ve çalışma ilkesinin şematik gösterimi [(43) numaralı kaynaktan hareketle yeniden düzenlenmiştir].

Yüksek enerjili bilyalı değirmenlerde; numunenin ve bilyaların yer aldığı silindirik hazne, kısa yanal hareketlerle ileri geri salınımlar yapar. İleri ve geri

<sup>1</sup> *Coriolis* kuvveti, dönen bir platformun merkezinden karşı tarafına yürümeye çalışan biri tarafından anlaşılabilir. Coriolis kuvveti; yer çekimi, manyetik kuvvetler veya elektrik kuvvetleri gibi gerçek bir kuvvet değildir. Ekseni etrafında dönen yani ivmeli hareket yapan bir gözlem çerçevesinde hissedilen, “gerçek olmayan” bir kuvettir.



salınımlar haznenin yanal hareketleri ile birleştiğinde hazne sonsuzluk işareti ( $\infty$  işareti) çizerek hareket etmiş olur (Şekil 2.7.). Yapmış olduğu bu hareket ile, hazne ve bilyalar arasında oluşan yüksek enerji, örneğin partikül büyüklüğünün küçültülmesini sağlar. Yüksek enerjili bilyalı değirmenin yapmış olduğu  $\infty$  işaretinin, diğer değirmenlerde bulunan yan yana veya gezegensel hareketten daha verimli olduğu belirtilmektedir ve nano-öğütme işleminde daha fazla tercih edilmektedir (44).



**Şekil 2.7.** Yüksek enerjili bilyalı değirmen ve çalışma ilkesinin şematik gösterimi [(44) numaralı kaynaktan hareketle yeniden düzenlenmiştir].

### 2.1.3. Yaş ve Kuru Öğütme (*Wet and Dry Milling*)

Bilyalı değirmenler, yaş ve kuru yöntem ile öğütme işlemi yapabilmektedir. Yaş öğütme işleminde öğütme ortamı; su veya ilaç etkin maddesi için uygun olabilecek bir çözücü/tampon ortamı, etkin madde ve stabilizan olarak görev yapan yardımcı maddeden oluşur (9, 30, 34, 35). Yaş ve kuru öğütme ile etkin maddelerin partikül büyüklüğünün birkaç mikrometreye kadar küçültülebilmelerine rağmen, sudaki çözünürlüğü çok düşük olan etkin maddelerin çözünürlüğünü, çözünme hızını ve absorpsiyonunu arttırmak için partikül büyüklüğündeki bu değişim yeterli olmamaktadır. İlaçların çözünürlüğünün artırılması, partikül büyüklüğünün mikronaltı/nano-boyuta küçültülmesi ile mümkün olabilmektedir. Bu nedenle etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri ve stabilitesi göz önünde bulundurularak en uygun stabilizan maddeler seçilir ve bilyalı değirmende yaş öğütme (*wet media milling, nano-milling*) yapılır (Şekil 2.8.) (9, 32, 35). Yaş öğütme bileşimi için seçilen stabilizan maddeler, agregasyon oluşumu, partiküllerin sedimentasyon hızı, öğütme veya saklama sürecinde kek oluşumu açısından belirleyici rol oynar. Yaş öğütme



öğütülmesi sonucu öğütme süresinin artmasına bağlı olarak kristalliği azalmış nano-boyutta meloksikam partikülleri elde edilmiştir (50, 51). Polimorfik yapı değişikliği, etkin maddenin fizikokimyasal özelliklerine ve birlikte öğütüldüğü yardımcı maddenin özelliklerine bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir (25).

Yaş öğütme sonucu, parenteral dozaj şekilleri için nanosüspansiyonlar üretilebilir. Nanokristal içeren süspansiyonlar; püskürterek kurutma, dondurarak kurutma, yaş granülasyon, pelletler üzerine kaplama gibi alternatif yöntemler kullanılarak katı dozaj şekillerine dönüştürülebilir (9, 32). Yaş yöntemle öğütülerek nano-boyuta küçültülen ve ilaç piyasasında yer alan ürünlerden bazıları; Rapamune<sup>®</sup>, Emend<sup>®</sup>, Tricor<sup>®</sup>, Lipanthyl<sup>®</sup>, Megace<sup>®</sup> ES, Invega<sup>®</sup> Sustenna<sup>®</sup>, Xeplion<sup>®</sup>'dir (45). Aynı zamanda naproksen, griseofulvin, fenofibrat, ibuprofen, paklitaksel, indometazin, kandesartan, nifedipin, dihidroartemisin, meloksikam etkin maddelerinin çözünürlüğünün artırılması amacıyla yaş yöntemle öğütme çalışmaları yapılmıştır (9, 50, 52-54).

Öğütme işlem basamaklarını azaltmak ve işlemi kolaylaştırmak için diğer bir yöntem olan kuru öğütme sistemi tercih edilebilir. Özellikle etkin madde üreticileri tarafından kullanılan bu yöntem üretilen etkin maddenin hedeflenen partikül büyüklüğü dağılımında olmasını sağlar. Kuru öğütme yöntemi, farmasötik teknoloji alanında etkin maddelerin mekanik olarak partikül büyüklüğünü küçülterek ve sıvıyla temas yüzey alanını artırarak sudaki çözünürlüğünü, çözünme hızını iyileştirmek için kullanılmaktadır. Ancak kuru öğütme işleminde öğütülmüş partiküllerin yeniden aglomere olma olasılığı bulunmaktadır (45). Son yıllarda yapılan çalışmalarda stabilizatör ve yüzey etkin madde işlevi gören yardımcı maddelerin kullanılması ile kuru öğütme yönteminin, çözünürlüğün artırılması için daha etkili bir yöntemle dönüştüğü gösterilmiştir (55-58).

#### **2.1.4. Birlikte Kuru Öğütme (*Dry Co-Milling*)**

Birlikte kuru öğütme yönteminde etkin madde, farklı yardımcı maddeler ve/veya yüzey etkin maddeler ile birlikte öğütülür. Kuru öğütmede, oluşan mekanik enerji, Van der Waals kuvvetleri veya hidrojen bağı yoluyla etkin madde-yardımcı etkileşimlerini teşvik eder. Ortaya çıkan etkin madde-yardımcı bileşimi, etkin

maddenin katı dispersiyonu olarak tanımlanır ve bu katı dispersiyonlarda partiküllerin aglomerasyon riski daha düşüktür (9).

Çözünürlüğü düşük etkin maddelerin, çözünürlüğünü ve çözünme hızını artırmak için kullanılan mekanik-kimyasal aktivasyon yöntemi, kuru ve yaş öğütme ile uygulanmakta, bu uygulama sonucu katı dispersiyonlar üretilmektedir. Birlikte öğütme işlemi, diğer katı dispersiyon hazırlama yöntemleri ile karşılaştırıldığında işlemin basit olması, çözücü kullanımına gerek olmaması ile üstünlük sağlamaktadır. Birlikte öğütme ile üretilen katı dispersiyonların, tamamının amorf şekilde olmamasına rağmen etkin maddelerin çözünürlüğünü arttırmada büyük bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. Literatürde yer alan mevcut çalışmaların sonuçları, polimerlerin etkin madde ile karışabilirlik düzeyinin, termal analizler ve spektroskopik yöntemler kullanılarak belirlenebileceğini göstermektedir (59, 60).

Birlikte kuru öğütme yöntemi ile öğütülerek mikronaltı/nano-boyuta küçültülen, çözünürlüğü, çözünme hızı arttırılan Vivlodex (meloksikam), Zorvolex™ (diklofenak), Tivorbex (indometazin) ürünleri FDA tarafından onaylanmış ve hastaların kullanımına sunulmuştur. Bu ürünler için uygulanan birlikte kuru öğütme yöntemi SoluMatrix Fine Particle Technology™ olarak isimlendirilmektedir. Bu yöntemin uygulanması ile organik/farmasötik etkin maddelerin ortalama partikül büyüklüğü, başlangıç değerinden 10 ila 200 kat daha küçük, partikül büyüklüğü dağılımı 200-800 nm aralığında elde edilmiştir (61). Meloksikam, diklofenak ve indometazin etkin maddelerinin bu yöntem ile üretilmesi sonucu elde edilen ürünler ve ürün özellikleri patent korumasına alınmıştır (62-64). SoluMatrix teknolojisi, bu üç etkin maddenin farmakokinetik özelliklerinin iyileştirilmesini sağlayarak, daha düşük dozlarda kullanımının mümkün olmasını sağlamıştır. Bu teknoloji ile meloksikam için farmasötik dozaj şekillerinin 15 mg ve 7,5 mg olan yitilikleri, 10 mg ve 5 mg olacak şekilde, indometazin için 50 mg ve 25 mg olan yitilikleri, 40 mg ve 20 mg olacak şekilde, diklofenak için 50 mg ve 25 mg olan yitilikleri, 35 mg ve 18 mg olacak şekilde azaltılmıştır.

Literatürde henüz ticari ürüne dönüşmemiş olmasına rağmen birlikte kuru öğütme yöntemi ile çözünürlüğünün arttırması hedeflenen birçok etkin maddeye ilişkin çalışma bulunmaktadır. Sudaki çözünürlüğü düşük, antidiyabetik bir etkin madde olan glisentid için yapılan kuru öğütme çalışmalarında, tek başına öğütme ve

birlikte öğütme teknikleri kullanılmıştır. Birlikte öğütme yapılması sonucunda, daha kısa öğütme süresinde çözünme hızı artırılmış partiküller üretildiği raporlanmıştır (65).

### 2.1.5. Birlikte Kuru Öğütme Yöntemi ile Hazırlanan Katı Dispersiyonlar

Katı dispersiyonlar, sudaki çözünürlüğü düşük etkin maddeler için en yaygın tercih edilen yaklaşımlardan biridir. Katı dispersiyonlar, etkin maddenin katı dispersiyondaki polimorfik şekline göre, kristal veya amorf olarak sınıflandırılabilir. Literatürde yer alan çalışmalarda, amorf katı dispersiyonlar, düzensiz yapılarından ve daha yüksek serbest enerjilerinin olmasından dolayı, kristal katı dispersiyonlara göre daha fazla tercih edilmiştir (66, 67).

Katı dispersiyonlar, sıcak eriyik ekstrüzyon (*hot melt extrusion*) yöntemi, püskürterek kurutma (*spray drying*) yöntemi, birlikte kuru öğütme (*dry co-milling*) ve süper kritik akışkan teknolojisi (*supercritical fluid technology*) üretim yöntemleri ile üretilmektedir (66-68). Ancak birlikte kuru öğütme diğer yöntemler ile karşılaştırıldığında; tek basamaklı bir işlem olması, işlemde organik çözücülerin kullanılmaması ve sıcaklık uygulanmaması gibi üstünlüklere sahiptir. Birlikte kuru öğütme işleminde, yüksek düzeyde mekanik enerji, partiküllerin küçülmesine ve eş zamanlı olarak kristal yapıda değişikliklere neden olabilir (67).

Literatürde, meloksikam, telmisartan, atorvastatin, tadalafil, niflumik asit, nifedipin ve lamotrigin, furosemid, prazikuantel, brobukol, sumatriptan, norfloksasin, bikalutamid, ibuprofen ve zaltoprofen etkin maddelerinin birlikte kuru öğütme yöntemi ile hazırlanan katı dispersiyonlarına ilişkin çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda birlikte kuru öğütme tekniği ile partikül büyüklüğü etkili bir şekilde küçültülmüş ve oluşturulan katı dispersiyonlar ile çözünürlük artırılmıştır (34, 52, 56, 57, 66-79). Literatürde, sıcak eriyik ekstrüzyon ve birlikte kuru öğütme yöntemlerinin kombine kullanıldığı ve çözünme hızının artırıldığı çalışmalar da bulunmaktadır (66).

## 2.2. Tasarımla Kalite (*Quality by Design, QbD*)

Tasarımla kalite (QbD), endüstride ürün ve işlem kalitesini iyileştirmek için kullanılan, ilaçların keşfi, geliştirilmesi ve üretimi süreçlerinde yaygın olarak uygulanan sistematik bir yaklaşımdır. 2004 yılında FDA tarafından yayınlanan “21.

Yüzyıl İçin Farmasötik Güncel İyi İmalat Uygulamaları (cGMP)-Risk Tabanlı Yaklaşım Raporu”nda QbD’ye ilişkin bilgilere yer verilmiştir (19, 80).

QbD, önceden tanımlanmış hedeflerle ilaçların tasarımında, geliştirilmesinde ve üretilmesinde istatistiksel, analitik ve risk yönetimi metodolojisi kullanarak ilaç kalitesini sağlayan sistematik bir yaklaşımdır (19). Beşeri İlaçların Ruhsatlandırılmaları için Teknik Gerekliliklerin Uyumu üzerine Uluslararası Konsey (*The International Council on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH*), QbD’yi aşağıdaki şekilde tanımlamaktadır (çeviri) (20): “QbD önceden belirlenmiş hedeflerle başlayan ve ürün ile işlemi ve işlem kontrolünü anlamayı vurgulayan, güvenilir bilime ve kalite risk yönetimine dayalı sistematik bir farmasötik geliştirme yaklaşımıdır”. Farmasötik ürünlerde tasarımla kalitenin sağlanması sürecinde, ICH Q8 (R2) (*Pharmaceutical Development*), ICH Q9 (*Quality Risk Management*), ve ICH Q10 (*Pharmaceutical Quality System*) rehberlik etmektedir (81, 82).

QbD tanımında bulunan önceden belirlenmiş hedeflere ilişkin ayrıntılı bilgiler ICH rehberinde verilmiş ve QbD kapsamında farmasötik geliştirme çalışmaları için gerekli olan bileşenler tanımlanmıştır (81).

- Kalite hedefli ürün profilinin (*Quality Target Product Profile, QTPP*) belirlenmesi,
- Kritik kalite özelliklerinin (*Critical Quality Attributes, CQAs*) belirlenmesi,
- Kritik materyal özelliklerinin (*Critical Material Attributes, CMAs*) belirlenmesi,
- Kritik işlem parametrelerinin (*Critical Process Parameters, CPPs*) belirlenmesi,
- Uygun bir üretim işleminin seçilmesi,
- Bir kontrol stratejisinin tanımlanması,
- Tasarım aralığının (*Design Space*) oluşturulması.

QbD, farmasötik geliştirme çalışmalarının tamamı için uygulanan bir yaklaşımdır ve bu yaklaşımın uygulanabilmesi için deney tasarımına gereksinim vardır. Deney tasarımının (*Design of Experiments, DoE*), üretim işlemlerini veya formülasyonun sağlamlığını test edebilecek parametreler kümesinden ve aralıklardan oluşan bir tasarım aralığı (*Design Space*) içermesi QbD’nin anlaşılabilirliği için

gereklidir. Bu nedenle ön deneylerde, araştırmacının bilgi birikimi ve literatürde yer alan çalışmalar doğrultusunda bir tasarım aralığı oluşturulur. Aynı zamanda işlem analitik teknoloji (*Process Analytical Technology, PAT*) kullanılarak gerçek zamanlı analizler yapılır (19).

QbD'nin ilaç endüstrisine duyurulması ve kapsamının tanımlanması sonrası yeni ürün ve yeni işlem geliştirme süreçlerinde, ölçek büyütme çalışmalarında ve birçok farklı farmasötik alanda kullanılmaya başlanmıştır. QbD'nin uygulanabilmesi ve deney sonuçlarının yorumlanabilmesi için ilaç endüstrisinde farklı istatistiksel deney tasarımları kullanılmaktadır.

### **2.2.1. Deney Tasarımı (*Design of Experiments, DoE*)**

Deney tasarımı ürünün hedeflenen özelliklere sahip olmasını sağlamak için uygulanan, cevaplardaki önemli değişikliklerin nedenlerini belirleyebilmek için, girdi faktörlerinde bilinçli olarak değişikliklerin yapıldığı sistematik bir testler dizisidir.

Geleneksel deney tasarımlarında her defasında bir etken değiştirilerek (*One Factor at a Time, OFAT*), diğer tüm faktörler sabit tutularak cevap üzerine etki araştırılır. Bu deney tasarımlarında, ürünün kalitesini etkileyen tüm etkenleri test etmek için çok sayıda deney yapılması gereklidir. Aynı zamanda bu tasarımlar ile sadece tek etkenin etkisi yorumlanabilir ve etkenler arası etkileşimlerin etkisinin değerlendirilmesi mümkün değildir. Bu nedenle çok sayıda etkeni aynı anda değiştirerek cevap üzerindeki etkilerini, etkenler arasındaki etkileşimlerin incelenmesini ve tüm bunların minimum deney sayısı ile yapabildiğini sağlayan faktöriyel deney tasarımları geliştirilmiştir (21, 22).

Faktöriyel tasarımda ilk olarak tarama deneyleri yapılarak optimizasyon deney tasarımında kullanılacak tasarım aralığı netleştirilir. Tarama deneylerinde, cevap üzerine etkisi bilinmeyen etkenlerin “etkili” ve “etkisiz” şeklinde sınıflandırılması için kesirli faktöriyel tasarımlar veya Plackett-Burman gibi birinci dereceden deney tasarımları kullanılır. Etkenlerin etkilerini, etkenler arası etkileşimleri belirlemek ve ürünü/işlemi optimize etmek için ise Box-Behnken, Merkezi Kompozit (*Central Composite*) gibi ikinci dereceden deney tasarımları kullanılır. Tüm bunlara ek olarak karışım deneyleri olarak isimlendirilen ve etkenlerin

bir karışımın bileşenleri olduğu, cevabın etkenlerin oranlarının bir fonksiyonu olduğu durumlarda kullanılan deney tasarımları da mevcuttur (22, 83).

### 2.2.2. Plackett-Burman Deney Tasarımı

Plackett-Burman deney tasarımları, çözünürlüğü III, 2 düzeyli ve tam faktöriyel deney tasarımları ile karşılaştırıldığı zaman ana etkilerin taranması için gerekli deney sayısının azaltılmasını sağlayan tasarımlardır. Bu tasarımda, faktöriyel deney tasarımından farklı olarak deney sayısı, genellikle ikinin bir kuvveti olmayıp dördün katı ( $N = 12, 20, 24, 28, 36 \dots$ ) olarak tasarlanır. Toplam deney sayısı, incelenen toplam etken sayısından bir fazladır ( $N$ : etken sayısı,  $N+1$ : deney sayısı). Ancak deney sayısı arttırılmak istenildiğinde dördün katı ( $N = 12, 20, 24, 28, 36 \dots$ ) olan bir deney sayısı belirlenerek tasarımın çözünürlüğü arttırılabilir (Şekil 2.10.). Deney tasarımında -1 ve +1 kodlanmış düzeyleri kullanılarak ortogonal bir matris oluşturulur (Tablo 2.1.) (83, 84).

Create Screening Design: Display Available Designs														
Available Factorial Designs (with Resolution)														
Run	Factors													
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
4	Full	III												
8	Full	IV	III	III	III									
16		Full	V	IV	IV	IV	III	III	III	III	III	III	III	III
32			Full	VI	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV
64				Full	VII	V	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV
128					Full	VIII	VI	V	V	IV	IV	IV	IV	IV

Available Resolution III Plackett-Burman Designs					
Factors	Runs	Factors	Runs	Factors	Runs
2-7	12,20,24,28,...,48	20-23	24,28,32,36,...,48	36-39	40,44,48
8-11	12,20,24,28,...,48	24-27	28,32,36,40,44,48	40-43	44,48
12-15	20,24,28,36,...,48	28-31	32,36,40,44,48	44-47	48
16-19	20,24,28,32,...,48	32-35	36,40,44,48		

Şekil 2.10. Minitab® 19 yazılımında oluşturulabilecek bir Plackett-Burman deney tasarım matris örneği.



**Tablo 2.1.** Plackett-Burman deney tasarım matrisi  $N$ , etken sayısı: 11;  $N+1$ , deney sayısı: 12.

Deney	Etkenler										
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	$X_6$	$X_7$	$X_8$	$X_9$	$X_{10}$	$X_{11}$
1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
2	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1
3	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1
4	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1
5	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1
6	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1
7	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1
8	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1
9	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1
10	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1
11	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1
12	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1

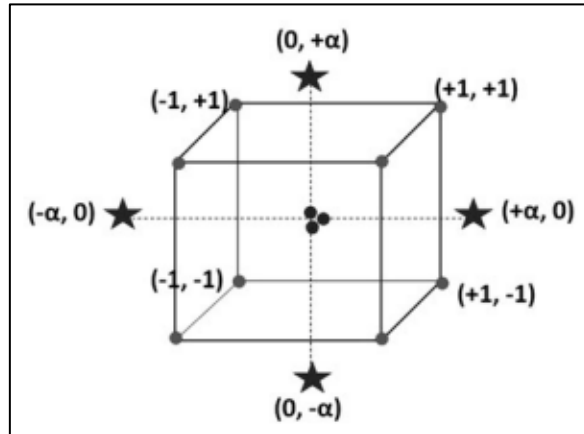
Plackett-Burman deney tasarımında sadece ana etkilerin etkisi incelenebilmekte ve etkenler “etkili” ve “etkisiz” şeklinde sınıflandırılmaktadır. Etkenler arası etkileşimler ihmal edilebilir olmadığına veya bu etkileşimlerin etkisi bilinmediğinde; bu etkileşimler, ana etkiler ile karıştırılabilirler ve bu durum tasarımın ana etkiler ve etkenler arası etkileşimleri arasında ayırım yapılmasına izin vermediği anlamına gelir (Bu durum *aliasing* veya *confounding* olarak isimlendirilir.) (83, 84).

### 2.2.3. Merkezi Kompozit Deney Tasarımı (*Central Composite Design, CCD*)

Cevap Yüzey Metodolojisi (*Response Surface Methodology, RSM*) hedef ürün profiline ulaşabilmek için en iyi deney koşullarını seçerek az sayıda deney yapılmasını sağlayan istatistiksel ve matematiksel modellerin bir kombinasyonudur. Bu metodolojinin faktöriyel tasarımdan farkı, cevap eğriliğinin incelemesini sağlayan etkenlerin karesi alınmış ikinci dereceden/kuadratik etkilerinin de belirlenebilmesidir. Bu sayede cevap değişkeni daha iyi anlaşılır ve optimize edilebilir (83-87).

Merkezi kompozit tasarımlar (CCD), minimum sayıda deney ile etkenlerin ana etkileri, ikincil/kuadratik etkileri ve etkenler arası etkiler hakkında ve genel deneysel hata hakkında bilgi sağlayan, çözünürlüğü V, ikinci dereceden bir modele sahip cevap yüzey tasarımlarıdır. CCD aynı zamanda “Box-Wilson tasarımı” olarak da bilinir. Bu tasarımlar çok iyi simetriye ve dönebilirliğe sahiptir ve ayrıca minimum deney ile maksimum bilgi elde edilmesini sağlar. Bu nedenle, farmasötik ürünlerin geliştirilmesinde ve üretim işlemlerinin optimizasyonunda en yaygın kullanımı olan cevap yüzey tasarımlarından biridir. CCD ile 2 ila 50 faktörün cevap değişkenler üzerine etkisi beş düzeyde  $(-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha)$  incelenebilir (83-87).

CCD, eğrilik etkisinin tahmin edilmesi sağlayan merkez noktaları ve yıldız/eksen noktaları ile faktöriyel tasarımdan ayrılır. Şekil 2.11.’de gösterilen şematik gösterim, faktöriyel noktaları, merkez noktalarını ve yıldız/eksen noktalarını içermektedir.



**Şekil 2.11.** Faktöriyel noktaları, merkez noktalarını ve yıldız/eksen noktalarını içeren CCD şematik gösterimi [(83) numaralı kaynaktan hareketle yeniden düzenlenmiştir].

CCD, verilen bir cevabın ikinci dereceden bir polinom regresyon modeline uyması için regresyon parametrelerinin tahmin edilmesini sağlar. Eşitlik 2.1. ile verilen bir üç değişkenli tasarıma ilişkin polinom denkleminde,  $y$ , cevabı;  $X_1, X_2$  ve  $X_3$ , bağımsız değişkenleri;  $\beta_0$ : intersepti;  $\beta_1 \beta_2 \beta_3$ : bağımsız değişken katsayılarını;  $\beta_{11} \beta_{12} \beta_{23}$ : bağımsız değişkenler arası etkileşimlerin katsayılarını;  $\beta_{11} \beta_{22} \beta_{33}$ : bağımsız değişkenlerin karesel terimlerinin katsayılarını ve  $\varepsilon$  modelle ilişkili bir hatayı ifade etmektedir.

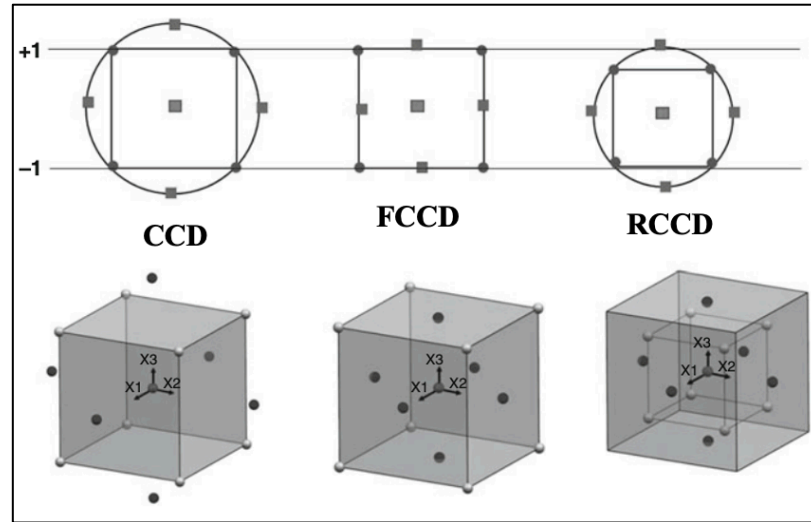
$$Y = \beta_0 + \beta_1 \times X_1 + \beta_2 \times X_2 + \beta_3 \times X_3 + \beta_{12} \times X_1X_2 + \beta_{13} \times X_1X_3 + \beta_{23} \times X_2X_3 + \beta_{11} \times X_1^2 + \beta_{22} \times X_2^2 + \beta_{33} \times X_3^2 + \varepsilon \quad (2.1.)$$

CCD uygulanırken, bloklama tekniği kullanılabilir. Bu teknik, herhangi bir potansiyel bloklar arası değişkenliği kontrol etmek için deneyi aynı bloklara bölerek bir deneyin kesinliğini büyütmektedir. Böylece, engelleme faktörleri nedeniyle deneysel sonuçlar üzerindeki herhangi bir etki tanımlanmakta ve en aza indirilmektedir, bu da engelleme yaklaşımını çok adımlı deneyler için yararlı hale getirmektedir. Bir CCD için, ortogonal blokların sayısı, faktör sayısına, çalışma sayısına ve seçilen tasarım fraksiyonuna bağlıdır. CCD, faktöriyel blok ve aksenal blok olacak şekilde ayrılabilir. Üç veya daha fazla etkenle, faktöriyel blok ayrıca iki veya daha fazla bloğa bölünebilir (83).

CCD'ler,  $\alpha$ 'nın düzeylerine ve değerlerine göre temel olarak iki farklı tipte sınıflandırılabilir (83):

- eksen/yıldız noktalarının faktöriyel noktalarla aynı düzlemde olduğu yüz merkezli merkezi kompozit tasarım (FCCD),
- eksen/yıldız noktalarının faktöriyel noktalarla aynı düzlemde bulunmadığı döndürülebilir merkezi kompozit tasarım (RCCD).

FCCD ve RCCD için şematik gösterimler şeki 2.12.'de verilmiştir.



**şekil 2.12.**  $\alpha$  düzeylerine ve değerlerine göre CCD tipleri [(86) numaralı kaynaktan hareketle yeniden düzenlenmiştir].

### **DoE için yaygın olarak kullanılan yazılımlar:**

Farmasötik ve diğer alanlarda yaygın olarak kullanılan DoE yazılımları; Design-Expert®, MODDE®, Unscrambler®, JMP®, Statistica®, Minitab®, SAS®, SPSS®'dir.

### **2.2.4. Bayes Optimizasyonu**

Bayes optimizasyonu (BO), girdilerle çıktıları arasındaki ilişkisi tam olarak bilinmeyen “kara kutu” fonksiyonların global optimizasyonu için sıralı bir deney tasarım stratejisidir. BO, verilen girdilere dayalı olarak hangi yeni veri noktalarının değerlendirileceğine yinelemeli olarak karar veren ve optimize edilmekte olan amaç fonksiyonunun modelini güncelleyen sıralı bir optimizasyon süreci kullanır. BO, optimum değeri klasik deney tasarımı stratejilerine kıyasla daha az sayıda deneyle bulabilir. Bu nedenle, genellikle değerlendirilmesi pahalı işlevleri optimize etmek için kullanılır (23). İlaç formülasyonu geliştirilirken, hedeflenen çıktılarla ilişkisi tam olarak bilinmeyen parametrelerin optimize edilmesi amaçlanmaktadır. Bu parametrelerle ilgili deneylerin maliyet ve zamanı düşünüldüğünde, optimum formülasyona daha az sayıda deneyle ulaşmak önemlidir. Bu sebeple BO formülasyon geliştirme için yüksek potansiyeli olan fakat henüz yaygın kullanılmayan bir yöntemdir.

BO, iki temel bileşene sahip yinelemeli bir algoritmadır. Bu bileşenlerin ilki optimize edilecek amaç fonksiyonunun olasılıksal vekil modeli, ikincisi bir sonraki deneyde hangi noktanın değerlendirileceğine karar veren edinme fonksiyonudur (88). Vekil model, bir dizi fonksiyon değerlendirmesine dayalı olarak başlatılır. Örneğin, BO'ya başlamadan önce değişik parametre değerleri ile birkaç deney yapılarak, bu deneylerin girdi ve sonuçları ile vekil model başlatılabilir. Vekil modelden bir sonraki deneyin değişik girdilerle hangi sonuçları üreteceğine ilişkin tahmin dağılımı alınır. BO'nun ikinci bileşeni olan edinme fonksiyonu, bu tahmin dağılımını kullanarak, bir sonraki deneyde kullanılabilecek değişik girdi alternatiflerinin fayda değerlerini hesaplar. Fayda değerleri keşfetme ve yararlanma arasındaki ödünleşimi gözetir. Bu ödünleşim, daha az bilinen, daha önce denenmiş değerlerden uzak veri noktalarını keşfetmek ile daha önceki denenmiş değerlerden en iyi sonuçlara sahip olanlara yakın değerler deneyerek, bu iyi bilinen veri noktalarından yararlanmak arasındaki dengeyi

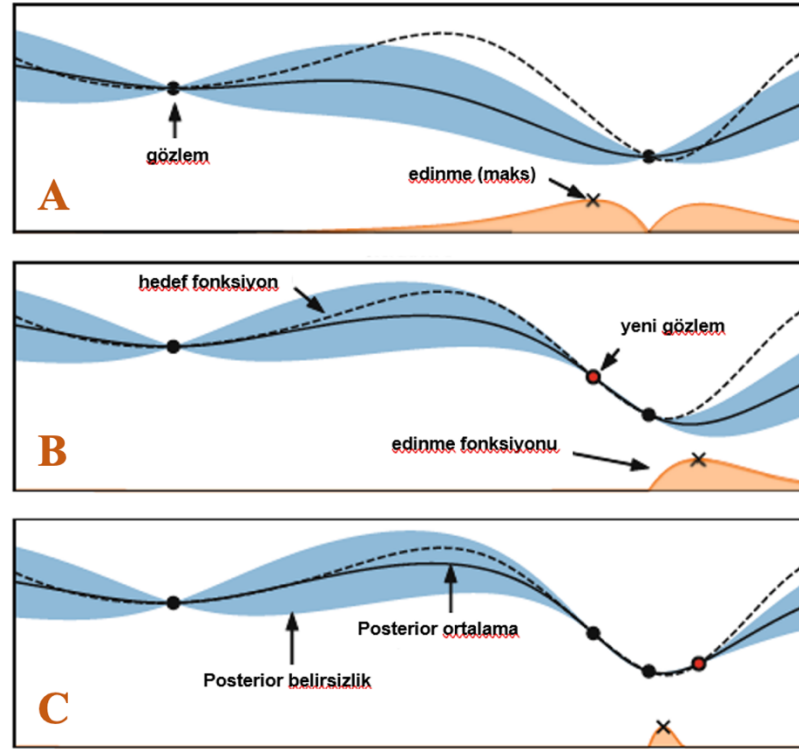
sağlamayı amaçlar. Edinme fonksiyonları, keşfetme ve yararlanma arasındaki bu ödünleşimi, deneye ilişkin tahminlere ve kullanılan edinme fonksiyonunun özelliklerine göre incelemektedir. Edinme fonksiyonunun önerdiği girdi değerlerine göre yeni deneyler yapılır ve vekil modelin tahminleri bu deneyin sonuçlarına göre güncellenir. Vekil modelin güncellenmesi ve edinme fonksiyonunun yeni değerler önermesi işlemi, deney sonlandırılana kadar yinelemeli olarak devam eder.

BO'ların genel hatlarıyla çalışma prensibi yukarıda anlatıldığı gibidir. Bu bölümün geri kalanında vekil model ve edinme fonksiyonu için kullanılan teknikler kısaca anlatılmıştır. BO, vekil fonksiyonlar ve yararlanma fonksiyonları hakkında daha ayrıntılı teknik bilgi için Archetti F, Candelieri A (2019) (89) incelenebilir.

BO'da vekil model olarak genellikle Gauss Süreci'ni (*Gauss Process-GP*) modelleri kullanılmaktadır. Bunun sebebi Gauss Süreci'nin belirsizlik tahminine uygun oluşu, değişik durumları temsil edebilecek kadar esnek olması ve hesaplama kolaylığıdır. Bir GP, fonksiyonlar üzerinde bir dağılımı tanımlayan Gauss dağılımının bir genellemesi olarak yorumlanabilir. Bir GP'yi tanımlamak için bir ortalama ve bir kovaryans fonksiyonu belirlemek gereklidir. Ortalama fonksiyonun BO'da genellikle sabit olduğu varsayılır ve amaç fonksiyonları üzerindeki sonsal dağılımları izlenebilir bir şekilde hesaplamak için kullanılır (88, 90). GP'lerde yeni deney sonuçlarına göre modeli güncellemek için gerekli hesaplar matematiksel olarak çözümlenebilir.

Şekil 2.13.'te tek girdi ve tek çıktı değişkenine sahip bir BO işleminin değişik yinelemeleri örnek olarak gösterilmektedir. Bu deneyde amaç çıktı değişkeninde en küçük değeri elde etmektir. Şekil 2.13.A'da, vekil modelin tahmin dağılımı mavi renk ile, edinme fonksiyonu sarı renk ile belirtilmiştir. Daha önce yapılan deneyler siyah noktalar ile gösterilmiştir. Şekil 2.13.A'da, daha önce yapılan 2 deneyin sonucu bilinmekte ve üçüncü deneyin hangi değerlerle yapılacağı BO ile belirlenmektedir. Henüz deney yapılmayan girdi değerlerine ilişkin vekil model tahminleri mavi renk ile gösterilmiştir. Bu şeklin altında, değişik girdi değerler için edinme fonksiyonunun fayda değerleri gösterilmektedir. Edinme fonksiyonunun en çok fayda beklediği ve önerdiği deney 'x' ile gösterilmiştir. Şekil 2.13.B'de edinme fonksiyonunun önerdiği girdi ile üçüncü deney yapılmış ve vekil modelin tahminleri güncellenmiştir. Bir sonraki önerilen deney yine 'x' ile gösterilmiştir. Şekil 2.13.C'de, üç deney sonucunda, vekil model optimum noktaya yönelik tahminleri konusunda daha emindir.

Edinme fonksiyonu yine 'x' ile gösterilen, mevcut daha önce yapılan deneylere yakın bir konumda deney önermiştir. Bu deneyde kullanılan edinme fonksiyonun keşfetme-yararlanma ödünleşiminde yararlanmaya daha fazla eğildiği görülmektedir. Edinme fonksiyonu hep daha önce bilinen en küçük noktalara yakın değerler için deney önermiştir. Farklı edinme fonksiyonlarının keşfetme-yararlanma davranışı farklı olabilir.



**Şekil 2.13.** Tek girdi ve tek çıktı değişkenine sahip BO işleminin değişik yinleme örnekleri: A'da vekil model tahmin dağılımı ve önceki gözlemler, B'de edinme fonksiyonunun önerdiği yeni gözlem, C'de güncellenen vekil model ile edinme fonksiyonunun önerdiği yeni gözlem gösterilmektedir [(58) numaralı kaynaktan hareketle yeniden düzenlenmiştir].

BO'da edinme fonksiyonu olarak kullanılabilen çok sayıda alternatif vardır. Bu alternatiflerden Beklenen İyileştirme (*Expected Improvement*, EI) ve Güven Sınırı (*Confidence Bound*, CB), BO için yaygın olarak kullanılır. EI, sırasıyla yararlanma ve keşfi yöneten iki terime sahiptir (91). Olasılıksal modelin tahmin dağılımını kullanan edinme işlevi, farklı aday noktaların faydasını, bu iki terimi (keşif ve yararlanmayı) ödünleşerek belirler (88).

Beklenen iyileştirme (EI) edinme fonksiyonunda, ilk terim (yararlanma) vekil fonksiyonun beklenen değeri ile birlikte artar ve ikinci terim (keşfetme) vekil

fonksiyonun tahmin belirsizliği ile artar. Maksimizasyon problemleri için; EI, Eşitlik 2.2.'deki gibi tanımlanır:

$$EI(x) = \begin{cases} (\mu(x) + \xi - f(x^+))\Phi\left(\frac{\mu(x) + \xi - f(x^+)}{\sigma(x)}\right) + \sigma(x)\phi\left(\frac{\mu(x) + \xi - f(x^+)}{\sigma(x)}\right) & , \text{if } \sigma(x) > 0 \\ 0 & , \text{if } \sigma(x) = 0 \end{cases} \quad (2.2.)$$

Bu eşitlikte  $f(x^+)$  amaç fonksiyonunun en iyi değeri,  $\mu(x)$  ve  $\sigma(x)$  GP modelinin  $x$  noktasındaki ortalaması ve standart sapmasını,  $\Phi(\cdot)$ : kümülatif Gauss dağılımını ve  $\phi(\cdot)$ : Standart Gauss dağılımın olasılık yoğunluk fonksiyonunu temsil eder.  $\xi$  keşif ve yararlanma arasındaki dengeyi ayarlamak için kullanılabilir.  $\xi$ 'nin daha yüksek değerleri, ilk terimi artırarak yararlanmayı teşvik eder.

Güven Sınırı (CB) edinme fonksiyonu, yeni veri noktalarını seçerken en iyimser durumu dikkate alır (88). Maksimizasyon problemleri için, üst güven sınırı bir kazanım fonksiyonu olarak kullanılabilir ve Eşitlik 2.3.'deki gibi tanımlanır:

$$UCB(x) = \mu(x) + \xi\sigma(x) \quad (2.3.)$$

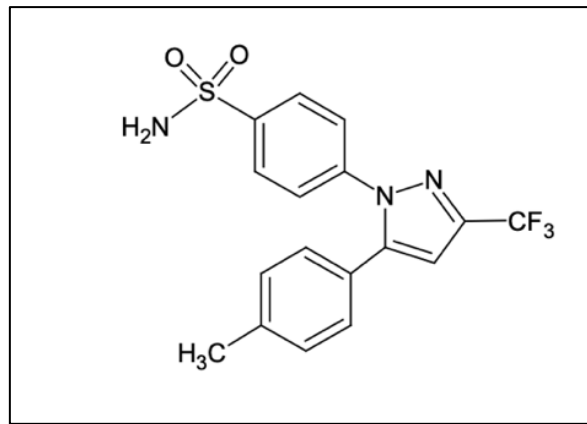
$\xi$ 'nin daha yüksek değerleri, daha yüksek güven seviyelerini göz önünde bulundurarak yararlanmayı teşvik eder.

BO, farmasötik ürünleri formüle ederken pahalı deneylerin sayısını azaltmak için uygun bir yaklaşım sunmasına rağmen BO bu görev için yaygın olarak kullanılmamıştır. Yakın zamanda Sano ve arkadaşları (92), tarafından yapılan çalışmada, ilaç formülasyon deneylerinde simüle edilmiş bir veri seti halinde BO kullanılmıştır. Veri seti, daha önce tamamlanmış bir formülasyon deney setine dayalı olarak, bir Yapay Sinir Ağı (YSA) modeli tarafından oluşturulmuştur. Başka bir deyişle, Sano ve arkadaşlarının çalışması YSA'yı gerçek model olarak kabul etmiş ve BO'nun bu modeli yeniden üretme yeteneğini değerlendirmiştir. BO'ya dayalı herhangi bir deney yapmamışlardır. Literatürde, bu çalışma dışında ilaç formülasyonuna ilişkin BO çalışmasına rastlanmamıştır.

## 2.3. Selekoksib

### 2.3.1. Selekoksibin Fizikokimyasal Özellikleri

Selekoksib, kimyasal ismi 4-[5-(4-Metil fenil)-3-(Triflorometil)-1H-pirazol-1-il] benzen sulfonamid, kapalı molekül formülü  $C_{17}H_{14}F_3N_3O_2S$ , molekül ağırlığı 381,38 g/mol, erime derecesi 160-164°C ve Kimyasal Kuramlar Servisi (CAS) numarası 169590-42-5 olan bir moleküldür. Kimyasal yapısı Şekil 2.14.'te verilmiştir (93-95).



Şekil 2.14. Selekoksibin kimyasal yapısı (95).

Selekoksib beyaza yakın renkte bir tozudur. Sudaki çözünürlüğü 5-40°C'de 5 µg/mL'dir ve pratik olarak çözünmez olarak ifade edilir. Metanol, aseton, etanol, etil asetat ve etilen klorürde çözünür. Selekoksibin pH 9'un altında çözünürlüğü pH değerinden bağımsızdır ve pH 12'de en yüksek düzeydedir. pKa değeri 11,1 (sülfonamid kısmı) olan çok zayıf asidik yapıda bir moleküldür. Bu nedenle fizyolojik pH değerlerinde büyük kısmı iyonik olmayan formdadır ve plazmada anyonik formda olan kısmı oldukça azdır. Hidrofobik bir moleküldür ve logP değeri 3,5 olup yağda yüksek oranda çözünebilmesi, hücre membranlarından pasif difüzyonla geçmesini sağlar. Dolayısıyla ile selekoksib, düşük çözünürlük, yüksek permeabiliteye sahip BCS Sınıf 2 bir moleküldür (96-98).

Selekoksib, triflurometil, pirazolin halkası ve sülfonamid grubu olmak üzere üç fonksiyonel moleküler grup içerir. Pirazolin halkasında tersiyer ve sekonderamin grupları bulunur. Sülfonamid grubunun pKa değeri 11,1'dir. Sülfonamid grubu,



molekülün hidrofilik bölgesini oluşturur ve H bağı yapılabilecek  $-NH_2$  grubu içerir (99, 100).

### 2.3.2. Selekoksib Endikasyonu

Selekoksib, seçici/selektif bir COX-2 inhibitörüdür; osteoartrit, romatoid artrit, ankilozan spondilit, juvenil romatoid artrit, akut ağrı, kas-iskelet ağrısı, kronik ağrı ve post operatif ağrı tedavisinde ve auralı veya aurasız akut migren tedavisinde endikedir (97, 98, 101).

### 2.3.3. Selekoksibin Farmakodinamik Özellikleri

Selekoksib, kimyasal olarak diğer arilamin dışı sülfonamidlere (örneğin, tiazidler, furosemid) benzeyen, ancak arilamin sülfonamidlerden (örneğin, sülfametoksazol ve diğer sülfonamid antibiyotikleri) farklılık gösteren diaril-süstitüe edilmiş bir pirazoldür.

Siklooksijenaz, prostaglandinlerin oluşumundan sorumludur. COX-1 ve COX-2 olmak üzere iki izoformu tanımlanmıştır. COX-2, pro-inflamatuvar uyarılar ile indüklendiği gösterilen ve ağrı, inflamasyon ve ateşin prostanooid mediatörlerinin sentezinin başlıca sorumlusu olduğu varsayılan enzim izoformudur. COX-2 ayrıca, ovülasyon, ductus arteriosus'un implantasyonu ve kapanması, böbrek fonksiyonu ve merkezi sinir sistemi fonksiyonlarının regülasyonunda da (ateş indüksiyonu, ağrı algısı ve bilişsel fonksiyon) rol oynamaktadır. COX-2 erkeklerde gastrik ülser çevresindeki dokuda tespit edilmiştir, ancak ülser iyileşmesi ile ilgisi henüz netleştirilmemiştir (102).

### 2.3.4. Selekoksibin Farmakokinetik Özellikleri

#### Absorpsiyon

Oral uygulama sonrası hızlıca absorbe olur ve açlık koşullarında maksimum plazma konsantrasyonuna 2-3 saatte ulaşır. Açlık koşullarında, maksimum konsantrasyon ( $C_{maks}$ ) ve eğri altında kalan (AUC), günde 2 kez 200 mg'a kadar doz ile orantısal bir şekilde artar; daha yüksek dozlarda  $C_{maks}$  ve AUC'de orantılı artışlardan daha az artış olur. Besinlerle (yüksek yağlı gıdalar) birlikte alınması,

selekoksibin absorpsiyonunda 1 saatlik bir gecikmeye neden olur ve  $t_{maks}$  değeri 4 saat olarak gözlenir. Aynı zamanda besin etkisi sonucunda biyoyararlanımı %20 oranında artar. Tekrarlı dozlama ile kararlı durum konsantrasyonuna 5. günde veya daha önce ulaşılır (13, 96-98, 102, 103).

### **Dağılım**

Plazma proteini bağlanma oranı, konsantrasyondan bağımsızdır ve terapötik plazma konsantrasyonlarında yaklaşık %97'dir. In vitro çalışmalar, selekoksibin öncelikli olarak albümine ve daha az ölçüde  $\alpha_1$ -asit glikoproteine bağlandığını göstermektedir. Selekoksib kanda seçici olarak eritrositlere bağlanmaz. Kararlı durumda görünen dağılım hacmi yaklaşık olarak 400 L'dir (13, 25, 103).

### **Metabolizasyon**

Büyük kısmı karaciğerde metabolize olur, küçük bir oranda (<%3) değişmemiş olarak elimine edilir. Temel metabolizasyon yolu metil hidroksilasyondur ve hidroksiselekoksib metaboliti oluşur. Bu reaksiyon, CYP3A4'ün minör bir etkisi olmasına rağmen esas olarak CYP2C9 tarafından katalize edilir. Hidroksiselekoksib, sistolik alkol dehidrogenaz ADH1 ve ADH2 tarafından oksidasyona uğrayarak karboksiselekoksibe dönüşür. Aynı zamanda bu metabolitin glukuronid konjugasyonu sonucu bir metabolit daha oluşur. Selekoksibin metabolitleri farmakolojik olarak aktif değildir. Selekoksibin metabolizasyonu esas olarak CYP2C9 tarafından olması nedeniyle, CYP2C9'da gözlenen polimorfizm selekoksibin farmakokinetiğinde ve etkisinde oluşan varyasyonun nedenini oluşturur (96-98, 102, 103).

### **Eliminasyon**

Temel eliminasyon yolu feçes ve idrar ile eliminasyondur. Tekrarlanan dozlarda selekoksibin yarılanma ömrü 8-12 saattir ve plazma klerensi yaklaşık 500 mL/dk'dır (96-98, 102, 103).

### **2.3.5. Selekoksibin Çözünürlüğünü Arttırmak için Kullanılan Teknolojiler**

Selekoksibin fizyolojik pH ortamlarında çözünürlüğünü ve çözünme hızını arttırmak için farklı farmasötik teknolojiler kullanılmıştır (104-108). Katı fosfolipid

dispersiyonlar (109), nanosüspansiyonlar (110, 111), nanoemülsiyonlar (112), lipid-silika hibridler (113), siklodekstrin inklüzyon kompleksleri (114), nano miseller (115), lipozomlar (116) nanokristaller (117) bu teknolojilerden bazılarıdır.

### 2.3.6. Selekoksib Piyasa Preparatları

Selekoksibin piyasada kapsül, tablet ve oral çözeltisi bulunmaktadır. Kapsül dozaj şekli Celebrex® (Pfizer), amlodipin ile sabit doz kombinasyonu olan tablet şekli Consensi® (Purple Biotech), tramatomol ile ko-kristal yapısındaki tablet şekli Seglenti® (Esteve) ve oral çözelti şekli Elyxyb™ (Biodelivery Sciences) ticari isimleri ile piyasada bulunan referans ürünlerdir. Aynı zamanda kapsül dozaj şeklinde çok sayıda jenerik ürün bulunmaktadır.

Celebrex®, 50 mg, 100 mg, 200 mg ve 400 mg yitilikleri ile osteoartrit, romatoid artrit, juvenil romatoid artrit, ankilozan spondilit, akut kas iskelet sistemi ağrıları, kronik ağrı ve post operatif ağrı tedavisinde kullanılmaktadır (98).

Consensi®, osteoartrit kaynaklı ağrının ve hipertansiyonun kombine bir ürün ile tedavi edilmesini sağlayan selekoksib ve amlodipin besilat içeren tablet şeklinde bir üründür. 200 mg selekoksibin sırasıyla 2,5 mg, 5 mg ve 10 mg amlodipin besilat ile kombine edildiği 200 mg/2,5 mg, 200 mg/5 mg ve 200 mg/10 mg sabit doz yitiliklerine sahiptir (18). 2018 yılında ruhsatlanan selekoksib-amlodipin sabit doz kombinasyonundan US9662315B2 numaralı patentte ayrıntılı olarak bahsedilmektedir (118).

Seglenti®, etkin madde olarak kısa etkili bir opioid olan tramadol ve selekoksibin ko-kristal şeklini içeren; yetişkinler için opioid analjezik gerektirecek kadar şiddetli ve alternatif tedavilerin yetersiz olduğu akut ağrı tedavisinde kullanılan ve dozaj şekli tablet olan bir üründür. Tromadol ve selekoksibin 1:1 moleküler oranda ko-kristallerinin hazırlanması sonucu oluşturulan üründe 56 mg selekoksib ve 44 mg tromadol bulunmaktadır (17). 2021 yılında ruhsatlandırılan selekoksib:tromadol ko-kristallerinin üretim yöntemi ve özellikleri EP2488170B1 numaralı patentte ayrıntılı olarak belirtilmiş ve patent korumasına alınmıştır (119).

Elyxyb™, auralı veya aurasız akut migren tedavisinde endike olan 25 mg/mL yitilikte oral çözelti şeklinde bir üründür. Selekoksibin hızlı bir şekilde absorbe olması ve maksimum plazma konsantrasyonuna Celebrex® ürününe kıyasla çok daha hızlı

ulaşması için geliştirilmiştir (101). 2020 yılında ruhsatlandırılan selekoksib oral çözelti formülasyonu ve uygulamasından US9795620B2 numaralı patentte ayrıntılı olarak bahsedilmektedir (120).

#### 2.4. Çözünürlük ve İntrinsik Çözünme Hızı (IDR)

Çözünürlük, çözünme ve geçirgenlik (permeabilite); ilaç absorpsiyon hızını, derecesini ve dolayısı ile biyoyarlanımı kontrol eden temel özelliklerdir (24, 26). BCS, ilaçların *in vitro* çözünmesini ve *in vivo* biyoyarlanımını ilişkilendiren çözünürlük ve permeabilite özelliklerine dayalı bir sınıflandırma sistemidir (24, 25). Güncel bilgilere göre, yeni ilaç adaylarının %70'den fazlasının sudaki çözünürlüğü düşüktür; BCS'ye göre Sınıf 2 ve/veya Sınıf 4 olarak sınıflandırılmaktadır (121).

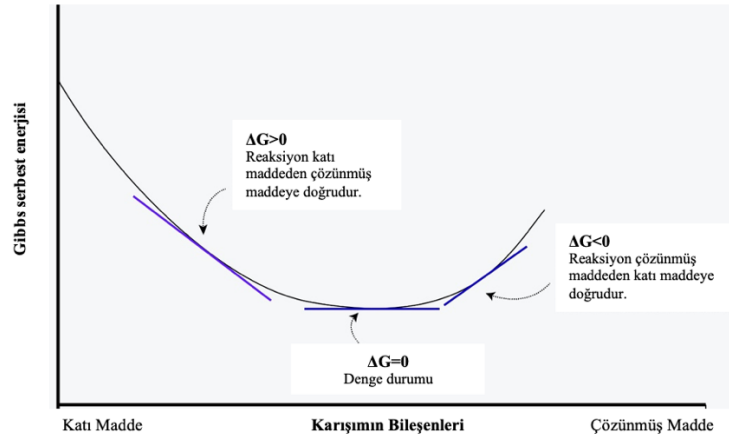
BCS, özellikle oral yoldan alınacak ilaç formülasyonlarının geliştirilmesi süreçlerinde kullanılan temel araçlardan biridir. Ancak son on yılda yapılan çalışmalarda, BCS'nin, *in vitro* çözünme ve *in vivo* biyoyarlanımı ilişkilendirmesi açısından; mide kompartmanlarında çözünmenin aşırı vurgulanması, *in vitro* ve *in vivo* ortamlardaki tampon kapasitesi arasındaki uyumsuzluk, çözünme ortamlarındaki safra bileşenlerinin eksikliği gibi sınırlamalarının olduğu raporlanmıştır. Bu eksiklikleri gidermesi ve formülasyon gelişim sürecine rehberlik etmesi için, ilaçların çözünme (hız) ve çözünürlüğünün (kapsamının) ölçümlerine dayanan stratejiler için Geliştirilebilirlik Sınıflandırma Sistemi (*Developability Classification System*, DCS) önerilmiştir (122, 123). *In vitro* ve *in vivo* ortamlardaki tampon kapasitesinin, etkin maddelerin pKa değeri ve intrinsik çözünme hızı bilgisi temel alınarak yorumlanabileceği belirtilmiştir (122). Aynı zamanda çözünme ortamındaki safra bileşenlerinin etkisini görebilmek ve bağırsak çözünürlüğünü tahmin etmek için açlık durumu yapay bağırsak sıvısı (*Fasted State Intestinal Fluid*, FaSSIF) ortamında çözünürlük çalışmaları yapılmaktadır (123).

##### 2.4.1. Çözünürlük

Çözünürlük, “belirli bir sıcaklıkta bir maddenin bir çözücü içinde çözülebilen maksimum konsantrasyonu” şeklinde tanımlanır (124). Çözünürlük, çözücünün özelliklerinden (örn. sıcaklık, pH, yüzey gerilimi, eklenen yüzey aktif maddeler, yardımcı çözücüler, tuzlar ve polarite) ve maddenin fizikokimyasal özelliklerinden

(örn. partikül büyüklüğü, yüzey alanı, pKa, polimorfik yapısı ve polarite) etkilenebilir (124-126).

Termodinamik (denge) çözünürlük, çözünmüş madde ile çözünmemiş katı maddenin fazlalığı arasında denge durumundaki çözücü içinde bulunan katı maddenin çözünürlüğüdür (125-128). Termodinamik çözünürlük, katı maddenin çözücüye aktarıldığında çözünmesini takiben sıvı maddenin oluşması ve sıvı maddenin çözücü ile karıştırılması şeklinde iki aşamalı olarak açıklanabilir. Bu aşamada, homojen bir faz oluşturmak için sıvı madde ve çözücü arasındaki denge, karıştırmanın Gibbs serbest enerjisi ( $\Delta G$ ) tarafından kontrol edilir (126, 128). Karışımın Gibbs serbest enerjisinin değişimi ve denge durumu Şekil 2.15.'te gösterilmiştir.  $\Delta G$  sıfırdan büyükse, reaksiyon yönü katı maddeden çözünmüş maddeye doğru;  $\Delta G$  sıfırdan küçükse reaksiyon tersi yöndedir,  $\Delta G$  sıfıra eşit olduğunda denge durumu oluşmaktadır (126).



Şekil 2.15. Karışımın Gibbs serbest enerjisinin değişimi ve denge durumu şematik gösterimi (126).

#### 2.4.2. İntrensik Çözünme Hızı

Çözünme, “iki fazın karıştırılmasıyla yeni bir homojen fazın (yani çözeltinin) oluşumu” olarak tanımlanır (129). Başka bir deyişle, katı madde ve sulu çözücünün başlangıç fazı ayrıdır, ancak karışıklarında, katı maddenin yüzeyinden ayrılan moleküller, çözelti adı verilen yeni bir homojen faz biçimine girdiğinde katı-sıvı ara yüzeyi dağılmaktadır (130, 131). Çözünme, yüzey kinetiği ve katı yüzeyden çözeltiye difüzyonla kontrol edilen moleküler kütle transferi ile doğrudan ilişkilidir (130, 132).

Çözünme hızı ile ilgili ilk açıklama 1897 yılında Noyes ve Whitney tarafından yapılmış, “katı bir maddenin kendi çözeltilinde çözünme hızı, o çözeltilinin derişimi ile doymuş çözeltilinin derişimi arasındaki farkla orantılıdır” şeklinde ifade edilmiştir. Noyes ve Whitney’in belirtmiş olduğu çözünme hızı modeli basit bir difüzyon olarak ifade edilmiştir. Çözünme mekanizması, çözücünün tüm kısımlarına difüzyonun olduğu, katı yüzey etrafında oluşan ince bir difüzyon tabakası ile ilişkilendirilmiş, bu durum karıştırma ile homojen hale getirilmiştir. Çözünürlük, difüzyon ve çözünme hızı arasındaki ilişkinin tanımlandığı Nernst–Brunner eşitliği Eşitlik 2.4.’te verilmiştir (133). Eşitlikte;  $dC/dt$  çözünme hızını,  $D$  difüzyon katsayısını,  $h$  difüzyon tabakasının kalınlığını,  $A$  yüzey alanını,  $C_s$  doymunluk konsantrasyonunu ve  $C_t$   $t$  zamanındaki çözünmüş madde konsantrasyonunu ifade etmektedir.

$$\frac{dC}{dt} = \frac{D}{h} A (C_s - C) \quad (2.4)$$

İlaç etkin maddesinin, sabit yüzey alanından çözünme akışı, intrinsik çözünme hızı (IDR) olarak ifade edilmektedir (134). IDR testinde, yüzey alanı, sıcaklık, pH, çalkalama veya karıştırma hızı ve çözünme ortamının iyonik gücü sabittir (135). Dolayısıyla, birim zamandaki tek değişiklik, çözünmüş madde miktarıdır. IDR, çözünürlükten farklı olarak konsantrasyon yerine birimi  $\mu\text{g}/\text{dk}/\text{cm}^2$  olan bir oran olarak ifade edilmektedir (136, 137).

IDR testi, Wood aygıtı (döner disk) ve sabit disk sistemi kullanılarak yapılmaktadır (134). Ancak bu aygıtlara ek olarak, daha az miktarda etkin madde gerektiren, test esnasında analiz yapılmasını sağlayan alternatif ve yenilikçi tasarımlar geliştirilmeye devam etmektedir. Minyatürize döner disk sistemi (mRDS) (137-141), minyatürize sabit disk sistemi (138), minyatürize intrinsik çözünme hızı taraması (MINDISS) (142), tek partikül intrinsik çözünme hızı tasarımı (143) intrinsik çözünme hızının belirlenmesi için yeni yaklaşımlardır.

IDR, yüzey alanının bütünlüğünü koruduğu ve çözünme hızının sıfırinci dereceden olduğu örnek zaman noktaları dikkate alınarak hesaplanmaktadır. Zamana karşı çözünmüş etkin madde miktarı ile çözünme profili oluşturulmakta, bu veriler ile basit regresyon analizi yapılarak çözünme profiline ilişkin doğru grafiği çizilmektedir. Bu doğrunun eğimi, disk yüzey alanı ve çözünme ortam hacmi ile Eşitlik 2.5.’te verilen formül kullanılarak IDR hesaplanmaktadır. Eşitlikte;  $dc/dt$  çözünme profiline

ilişkin doğrunun eğimini ( $\mu\text{g}/(\text{dk} \times \text{mL})$ ),  $A_{\text{disk}}$  disk yüzey alanını ( $\text{cm}^2$ ),  $V$  çözünme hacmini ( $\text{mL}$ ) ifade etmektedir (122).

$$IDR = V \frac{dc}{dt} \frac{1}{A_{\text{disk}}} \quad (2.5.)$$

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal ve Biyolojik Maddeler

<b>Madde Adı</b>	<b>Marka, Kaynak</b>
%37 Hidroklorik Asit (HPLC kalite)	Merck, Almanya
Asetonitril (HPLC kalite)	Merck, Almanya
Asetonitril (LC-MS kalite)	Merck, Almanya
Atorvastatin (İlaç kalite)	Dr. Reddy's, Hindistan
Caco-2 Hücre (insan kolon karsinoma hücre hattı)	American Type Culture Collection, ABD
Celebrex® 200 mg Kapsül	Pfizer, Porto Riko
Dibazik Sodyum Fosfat Heptahidrat (HPLC kalite)	Merck, Almanya
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich, ABD
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	BiochromAG, Almanya
Düşük Sübstitüeli Hidroksipropil Selüloz (L-HPC LH-21) (İlaç kalite)	Shin-Etsu, Japonya
FaSSIF/FeSSIF/FaSSGF Powder	Biorelevant, Birleşik Krallık
Fetal sığır serumu (FBS)	BiochromAG, Almanya
Formik Asit Çözeltisi (%98)	J.T. Baker, Hollanda
Glasiyel Asetik Asit (HPLC kalite)	Merck, Almanya
Hidroksietil Selüloz (Natrosol™ 250) (İlaç kalite)	Ashland, Almanya
Kroskarmelloz Sodyum (Ac-Di-Sol®) (İlaç kalite)	Dupont, ABD
Laktoz Monohidrat (FlowLac® 90) (İlaç kalite)	Meggle, İngiltere
Magnezyum Alüminyum Metasilikat (Neusilin®) (İlaç kalite)	Fuji Chemical, Japonya
Magnezyum Stearat (Ligamed® MF-2-V) (İlaç kalite)	Peter Greven, Almanya
Mannitol (Pearlitol® 100 SD) (İlaç kalite)	Roquette, Fransa
Metanol (HPLC kalite)	Merck, Almanya
Monobazik Sodyum Fosfat Monohidrat (HPLC kalite)	Merck, Almanya



Penicillin-Streptomycin Çözeltisi	Life Technologies, Inc., ABD
Polioksil 40 Stearat (Myrj™ S40) (İlaç kalite)	Croda, İngiltere
Polivinil Kaprolaktam-Polivinil Asetat-Polietilen Glikol Graft Copolimer (Soluplus®) (İlaç kalite)	BASF, Almanya
Polivinilpirolidon (Plasdone™ C-12, K-29/32, K-90) (İlaç kalite)	Ashland, Almanya
Selekoksisib (İlaç kalite)	Hetero Chemical, Hindistan
Sert Jelatin Kapsül (Coni Snap)	Capsugel, Fransa
Sodyum Asetat (HPLC kalite)	Merck, Almanya
Sodyum Hidroksit (HPLC kalite)	Merck, Almanya
Sodyum Lauril Sülfat (Kolliphor® SLS) (İlaç kalite)	BASF, Almanya
Su (LC-MS kalite)	Merck, Almanya
Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT)	AppliChem GmbH, Almanya
Tribazik Sodyum Fosfat Dodekahidrat (HPLC kalite)	Merck, Almanya
Ultra Saf Su	Mili-Q, Millipore, Türkiye
Vinilpirolidon ve Vinil Asetat Copolimer (Plasdone™ S-630) (İlaç kalite)	Ashland, Almanya

### 3.2. Kullanılan Cihazlar ve Aletler

Cihaz/Alet Adı	Marka, Kaynak
0,45 µm PTFE Filtre	Millex LG, Millipore, Billerica, MA, ABD
Cam flakon (amber renkli cam-1,5 mL) ve kapak	Isolab, Almanya
Cam İnsert (100 µL)	Isolab, Almanya
Cam pipet (1-5-10 mL)	Isolab, Almanya
Cam Tüp (5-10-20 mL)	Isolab, Almanya
Çok Noktalı Manyetik Karıştırıcı	Variomag Telesystem, Almanya
Derin Dondurucu (-20C)	Beko, Türkiye
Dissolüsyon Cihazı (Sotax AT 7smart)	Sotax CH-4123, İsviçre
DSC	Mettler Toledo, İsviçre

---

Enjektör (1 mL-5 mL-10 mL)	Genject, Türkiye
Ependorf Tüp (15-50 mL)	Isolab, Almanya
FTIR spektrometresi (Agilent Cary 630)	Agilent, ABD
Gezegen Hareketli Bilyalı Değirmen (Planetary Ball Mills PM 100)	Retsch, Almanya
Hassas Terazı	Mettler Toledo, İsviçre
HPLC (1200 series, UV Dedektör)	Agilent, ABD
HPLC Kolonu (Intersil® ODS-3V C18 250 x 4,6 mm, 5 µm)	GL Sciencıes, Japonya
HPLC Kolonu (Zorbax® Eclipse XDB- Phenyl L11: 250 mm x 4,6 mm, 5 µm)	Agilent, ABD
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	IKA, Almanya
LC-MS Kolonu (Intersil® ODS-4 C18, 50 x 2,1 mm, 3 µm)	GL Sciencıes, Japonya
LC-MS/MS	Shimadzu, Japonya
Manyetik Balık	Isolab, Almanya
Mayetik Balık Tutucu	Isolab, Almanya
Mikropipet (0,5-10, 10-100, 100-1000 µL)	Eppendorf, Almanya
Nitril Eldıven	Isolab, Almanya
Parafilm	Isolab, Almanya
pH Metre	Hanna Instruments, ABD
Santrifüj	Hermle Z383K, Almanya
Santrifüj Tüpü	Isolab, Almanya
SEM	Tescan GAIA FIB-SEM, Çek Cumhuriyeti
Stabilite Kabini	Memmert, Almanya
Termostatlı Yatay Çalkalayıcı	Memmert, Almanya
Thincerts™ cell culture inserts	Grenier Bio-one, Almanya
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, ABD
Ultrasonik Banyo	AdvantageLab, Almanya
Ultrasonik Homojenizatör (Sonopuls)	Bandelin, Almanya
USP Wood Aparatus	Biorelevant, Hollanda
Vorteks	IKA, Almanya
XRD Rigaku Ultima-IV Ray Diffractometer	Rigaku, Austin, TX, ABD

---

Zetasizer Nano ZSP system	Malvern Instruments, Malvern, Birleşik Krallık
---------------------------	---

### 3.3. Kullanılan Yazılımlar

Yazılım Adı	Marka, Kaynak
Chem Station Software	Agilent, ABD
Design Expert® 13	Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, ABD
LabSolutions software version 5.72	Shimadzu, Japonya
Minitab 19	Minitab, Birleşik Krallık
Phoenix WinNonlin (Version 8.1, Certara L.P.).	Certara, ABD
STAR <sup>e</sup> Excellence Yazılımı	Mettler Toledo, İsviçre

### 3.4. Deney Hayvanı

Tür	Marka, Kaynak
Sprague Dawley Erkek Sıçan	Kobay Deney Hayvanları A.Ş., Türkiye

### 3.5. Selekoksibin Fizikokimyasal Karakterizasyon Çalışmaları

Deneysel çalışmalarda kullanılan selekoksib etkin maddesinin işlem görmemiş şeklinin fizikokimyasal özelliklerini belirleyebilmek amacıyla karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

#### 3.5.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Selekoksibin moleküler olarak tanıma analizini yapmak amacıyla Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (*Fourier Transform Infrared*, FTIR) spektrumları çekilmiştir. FTIR analizi, Agilent Cary 630 FTIR spektrometresi (Agilent, ABD) ile 650 – 4000  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığında, 4  $\text{cm}^{-1}$  çözünürlükte yapılmış, her bir örnek 3 defa taranmıştır. Selekoksib etkin maddesi herhangi bir örnek hazırlama işlemine tabi tutulmadan, doğrudan analiz edilmiştir.

### 3.5.2. Selekoksib Etkin Madde Miktar Tayini

Selekoksibin etkin madde miktarının tayin edilebilmesi için, Avrupa Farmakopesi (EP), Amerikan Farmakopesi (USP) ve etkin madde üreticisi tarafından hazırlanan etkin madde ana dosyasında (DMF) belirtilen etkin madde miktar tayini yöntemi kullanılmıştır (93, 95). Bu analitik yöntem EP ve USP tarafından sunulan valide bir yöntem olduğu için analitik metodun valide edilmesi gerekliliği bulunmamaktadır. Bu nedenle yöntem parametreleri farmakopelerde belirtilen şekli ile kullanılarak etkin madde analizi yapılmıştır. Çözücü karışımı olarak su: metanol (25:75 h/h) karışımı kullanılmıştır.

**Test çözeltisi:** 50 mg selekoksib etkin maddesi tartılmış ve 100 mL çözücü karışımında çözündürülmüştür.

**Standart çözelti:** 50 mg selekoksib referansı tartılmış ve 100 mL çözücü karışımında çözündürülmüştür.

Hareketli faz olarak asetonitril, metanol ve tampon çözelti kullanılmıştır. Tampon çözelti, pH'sı fosforik asit ile 3,0'a ayarlanmış olan 2,7 g/L konsantrasyonundaki potasyum dihidrojen fosfattan oluşmaktadır. Hazırlanan örneklerin analizi için kullanılan analitik yöntemle ilişkin kromatografik koşullar Tablo 3.1.'de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** Selekoksib etkin madde miktar tayini analizi kromatografik koşullar.

Cihaz	: HPLC
Kolon	: L11; 250 mm x 4,6 mm, 5 µm
Dedeksiyon	: UV, 215 nm
Akış Hızı	: 1,50 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	: 25 µL
Kolon Sıcaklığı	: 60°C
Örnek Sıcaklığı	: Oda sıcaklığı
Analiz Süresi	: 100 dakika
Hareketli Faz	: Asetonitril: Metanol: Tampon Çözelti 10:30:60, pH 3,0

HPLC analizinden elde edilen pik alanları ile Eşitlik 3.1.'de belirtilen formül kullanılarak selekoksib miktar tayini hesaplanmıştır.

$$\frac{A_{TEST}}{A_{STD}} \times \frac{\frac{m_{STD}}{100} \times P \times (100 - y_{STD})}{\frac{m_{TEST}}{100} \times (100 - y_{TEST})} \times 100 \quad (3.1)$$

$A_{TEST}$ : Test çözeltisi kromatogramından elde edilen selekoksib pik alanı

$A_{STD}$ : Standart çözeltinin ardışık altı enjeksiyonundan elde edilen selekoksib ortalama pik alanı

$m_{TEST}$ : Test çözeltisindeki örnek tartımı (mg)

$m_{STD}$ : Selekoksib referans standart tartımı (mg)

$P$ : Selekoksib referans standardının potens değeri (kuru madde üzerinden)

$y_{STD}$ : Selekoksib referans standardının su içeriği (%)

$y_{TEST}$ : Örneğin su içeriği (%)

### 3.5.3. X-Işını Difraksiyonu (XRD)

Selekoksibin kristal şeklinin saptanabilmesi için X-ışını difraksiyonu (X-ray diffraction, XRD) analizleri yapılmış, analiz çalışmalarında Rigaku Ultima-IV Ray Diffractometer (Rigaku, Austin, TX, USA) XRD cihazı kullanılmıştır. Selekoksib örnekleri herhangi bir örnek hazırlama işlemine tabi tutulmadan, doğrudan analiz edilmiştir. 3-60° aralığında, 1°/dk tarama hızı kullanılarak ve 0,02° örnek genişliğinde ölçüm yapılmıştır. X-ışını kaynağı olarak Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ ) seçilmiş, gerilim 40 kV ve akım 30 mA olarak ayarlanmıştır. Yapılan ölçüm sonucu XG Operation PINT 2200 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

### 3.5.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)

Selekoksibin erime derecesinin tayin edilmesi ve öğütme işlemleri sonucunda yapısında meydana gelebilecek değişikliklerin saptanabilmesi için diferansiyel taramalı kalorimetri (*differential scanning calorimetry*, DSC) analizleri yapılmış, analiz çalışmalarında indiyum ile kalibre edilmiş DSC 3 (Mettler Toledo, İsviçre) cihazı kullanılmıştır. Yaklaşık olarak 5-8 mg aralığındaki selekoksib etkin maddesi alüminyum pana alınarak hermetik olarak kapatılmıştır. Örnek içermeyen eşdeğer bir pan referans olarak kullanılmıştır. Örnekler 10 °C/dk sıcaklık artışı ile 25-250°C aralığında taranmıştır. Analizler sırasında örneklerin üzerinden 30 ml/dk akış hızında azot gazı geçirilerek olası bir oksidasyon oluşumu engellenmiştir. Analizler iki kez tekrar edilmiştir ve ölçüm sonuçları Star<sup>e</sup> Excellence (Mettler Toledo, İsviçre) yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

### 3.5.5. Partikül Büyüklüğü Dağılımı (PSD)

İşlem görmemiş selekoksib etkin maddesinin başlangıçtaki partikül büyüklüğü dağılımını belirleyebilmek amacıyla Malvern Mastersizer 3000E Aero M (Malvern, Birleşik Krallık) cihazı kullanılarak ölçüm yapılmıştır. Etkin madde üreticisinin belirlediği test yöntemi kullanılmıştır (93). Test yöntemine ilişkin ayrıntılı bilgiler Tablo 3.2.'de verilmiştir.

**Tablo 3.2.** Selekoksib partikül büyüklüğü dağılımı analiz yöntemi.

Cihaz	: Malvern Mastersizer 3000E Aero M
Analiz Tipi	: Kuru analiz
Analiz Modeli	: Genel amaçlı
Partikül Refraktif İndeksi	: 1,5
Partikül Absorpsiyonu	: 0,1
Partikül Besleme Hızı	: %50
Numune Miktarı	: 2 gram
Hava Basıncı	: 1,3 bar
Ölçüm Süresi	: 6 saniye
Arkaplan Ölçüm Süresi	: 6 saniye
Karartma	: %0,5 – %5

### 3.6. Selekoksib Miktar Tayini Çalışmalarında Kullanılan Analitik Yöntem Validasyonu

Etkin maddenin analiz edilmesi aşamasında farmakopede ve DMF'de yer alan analitik yöntem kullanılmıştır. Öğütme bileşimleri içerisinde etkin maddeye ek olarak farklı yardımcı maddelerin yer alması, formülasyon geliştirme çalışmalarında farklı yardımcı maddelerin kullanılması nedeniyle bu maddelerle girişim yapmayan bir analitik yöntem gereksinim duyulmuştur. EP ve USP'de belirtilen etkin madde miktar tayini yönteminin hem etkin madde miktar tayini hem de safsızlık miktar tayini yöntemi olması nedeniyle analiz süresi yaklaşık olarak 100 dakika sürmektedir. Selekoksibin çözünürlük, intrinsik çözünme hızı, çözünme ve permeabilite çalışmalarından elde edilen örneklerdeki selekoksib miktarını tayin etmek için 100

dakikadan daha kısa ve valide edilmiş bir analitik yönteme gereksinim duyulmuştur. Bu amaçla, literatür taraması yapılmış ve literatürde yer alan valide edilmiş analitik yöntemler esas alınarak analitik yöntem belirlenmiştir (108, 144). Analitik yöntemin validasyon çalışmalarında ICH Q2/R1 “*Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*” rehberinde belirtilen validasyon parametreleri esas alınmıştır (145). Analitik yönteme ilişkin ayrıntılı bilgiler ve valide edilen yöntem parametreleri ilerleyen bölümlerde verilmiştir.

### 3.6.1. Kromatografik Koşullar ve Sistem

Tez çalışmaları kapsamında çözünürlük, intrinsik çözünme hızı, çözünme ve permeabilite çalışmalarından elde edilen örneklerdeki selekoksib miktarını tayin etmek amacıyla literatürden referans alınarak geliştirilen analitik yönteme ilişkin kromatografik koşullar Tablo 3.3.’te verilmiştir (108, 144). Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) (Agilent, 1200 series LC) kullanılarak yapılan analiz çalışmalarına ilişkin veriler ChemStation (Agilent, ABD) yazılımı kullanılarak işlenmiştir.

**Tablo 3.3.** Selekoksib etkin madde miktar tayini yöntemi için kromatografik koşullar.

Cihaz	: HPLC
Kolon	: C18; 250 mm x 4,6 mm, 5 µm C18
Dedeksiyon	: UV, 254 nm
Akış Hızı	: 1.00 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	: 20 µL
Kolon Sıcaklığı	: 30°C
Örnek Sıcaklığı	: Oda sıcaklığı
Analiz Süresi	: 12 dakika
Hareketli Faz	: Su:Metanol 25:75 (10 dakika degaze edilmiştir.)

### 3.6.2. Çözeltiler

**Seyreltme Çözeltisi:** Su:Metanol (25:75) karışımından oluşan hareketli faz, seyreltme çözeltisi olarak kullanılmıştır.

**Standart Çözelti-1 (240 µg/mL selekoksib):** 12 mg selekoksib çalışma standardı seyreltme çözeltisinde çözündürülerek 50 mL'ye tamamlanmıştır. Çözelti analiz öncesi 0,45 µm hidrofilik politetrafloroetilen (PTFE) (Millex LG, Milipore, Billerica, MA, ABD) filtreden süzümüştür.

**Standart Çözelti-2 (200 µg/mL selekoksib):** 10 mg selekoksib çalışma standardı seyreltme çözeltisinde çözündürülerek 50 mL'ye tamamlanmıştır. Çözelti analiz öncesi 0,45 µm hidrofilik PTFE filtreden süzümüştür.

**Standart Çözelti-3 (20 µg/mL selekoksib):** Standart çözelti-2'den 1 mL alınmış, seyreltme çözeltisi ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Çözelti analiz öncesi 0,45 µm hidrofilik PTFE filtreden süzümüştür.

**Test Çözeltisi-1 (240 µg/mL selekoksib):** 39.18 mg (12 mg selekoksib içermektedir) öğütülmüş karışım seyreltme çözeltisinde çözündürülerek 50 mL'ye tamamlanmıştır. Çözelti analiz öncesi 0,45 µm hidrofilik PTFE filtreden süzümüştür.

**Test Çözeltisi-2 (200 µg/mL selekoksib):** 32.65 mg (10 mg selekoksib içermektedir) öğütülmüş karışım seyreltme çözeltisinde çözündürülerek 50 mL'ye tamamlanmıştır. Çözelti analiz öncesi 0,45 µm hidrofilik PTFE filtreden süzümüştür.

**Test Çözeltisi-3 (100 µg/mL selekoksib):** Test çözeltisi-2'den 5 mL alınmış, seyreltme çözeltisi ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Çözelti analiz öncesi 0,45 µm hidrofilik PTFE filtreden süzümüştür.

**Plasebo Çözeltisi:** 22.65 mg plasebo (polivinilpirolidon, mannitol ve sodyum lauril sülfat içerir), seyreltme çözeltisinde çözündürülerek 50 mL'ye tamamlanmıştır. Çözelti analiz öncesi 0,45 µm hidrofilik PTFE filtreden süzümüştür.

**Doğruluk Çözeltisi-1 (240 µg/mL selekoksib):** 12 mg selekoksib çalışma standardı ve 27.18 mg plasebo, seyreltme çözeltisinde çözündürülerek 50 mL'ye tamamlanmıştır. Çözelti analiz öncesi 0,45 µm hidrofilik PTFE filtreden süzümüştür.

**Doğruluk Çözeltisi-2 (200 µg/mL selekoksib):** 10 mg selekoksib çalışma standardı ve 22.65 mg plasebo seyreltme çözeltisinde çözündürülerek 50 mL'ye tamamlanmıştır. Çözelti analiz öncesi 0,45 µm hidrofilik PTFE filtreden süzümüştür.

**Doğruluk Çözeltisi-3 (100 µg/mL selekoksib):** Doğruluk çözeltisi-2'den 5 mL alınmıştır, seyreltme çözeltisi ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Çözelti analiz öncesi 0,45 µm hidrofilik PTFE filtreden süzümüştür.



### 3.6.3. Sistem Uygunluğu

Kromatografik sistemin performansını değerlendirmek için 200 µg/mL konsantrasyonda selekoksib standart çözeltisi hazırlanmış ve ardışık altı enjeksiyon yapılmıştır.

### 3.6.4. Özgüllük

Geliştirilen selekoksib miktar tayini yönteminde, analitik yöntemin öğütme bileşimlerinde ve/veya formülasyon bileşiminde yer alan diğer maddelerden ayırt edebilme yeteneğini gösterebilmek için özgüllük testleri yapılmıştır. Bu amaçla, seyreltme çözeltisi, plasebo çözeltisi, standart çözelti (200 µg/mL) ve test çözeltisinden (200 µg/mL) birer adet örnek hazırlanmış ve her birinden birer enjeksiyon yapılmıştır. Bu çözeltilere ilişkin kromatogramlar üst üste çizilerek görsel olarak değerlendirilmiştir.

### 3.6.5. Doğrusallık ve Aralık

Geliştirilen selekoksib miktar tayini yönteminde, selekoksib konsantrasyonu ile pik alanı arasındaki ilişki incelenerek çözünürlük, intrinsik çözünme hızı, çözünme ve permeabilite testlerinde gözlenebilecek konsantrasyonları tayin etmek amacıyla 2 µg/mL-200 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusallık çalışması yapılmıştır. En küçük kareler yöntemi kullanılarak basit doğrusal regresyon analizi uygulanmış, regresyon katsayısı ve interseptin anlamlılığı test edilmiştir. Doğrusallık çalışmasında; bölüm 3.6.2'de açıklandığı gibi standart çözelti-2'nin seyreltme çözeltisi ile seyreltilmesi sonucunda 100 µg/mL, 50 µg/mL ve 20 µg/mL konsantrasyonlarda, standart çözelti-3'ün seyreltme çözeltisi ile seyreltilmesi sonucunda 10 µg/mL, 5 µg/mL ve 2 µg/mL konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanmıştır. Doğrusallık tayininde kullanılan tüm çözeltiler 0,45 µm hidrofilik PTFE filtrelerden süzöldükten sonra analiz edilmiştir.

### 3.6.6. Doğruluk

Geliştirilen selekoksib miktar tayini yönteminde, analitik yöntemin gerçek değerlere ne derece yakın sonuçlar verdiğini saptayabilmek için, 100 µg/mL, 200

$\mu\text{g/mL}$  ve  $240 \mu\text{g/mL}$  olmak üzere 3 ayrı konsantrasyonda doğruluk çözeltileri üç tekrarlı hazırlanmıştır. Standart çözeltiden altı enjeksiyon, doğruluk çözeltilerinin her birinden birer enjeksiyon yapılmıştır. Her bir konsantrasyon için % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

### 3.6.7. Kesinlik

Geliştirilen selekoksib miktar tayini yönteminde, analitik yönteminin gün içinde ve günler arası farklı ölçümleri arasındaki yakınlık derecesini göstermek için tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik çalışmaları yapılmıştır. Tekrarlanabilirlik çalışması için  $200 \mu\text{g/mL}$  konsantrasyonda standart ve test çözeltilerinden altı enjeksiyon yapılmıştır. Altı enjeksiyona ilişkin bağıl standart sapma (RSD) (%) hesaplanmıştır. Ara kesinlik çalışması için tekrarlanabilirlik testinin yapıldığı gün ve farklı bir gün boyunca test çözeltilerinden altı enjeksiyon yapılmıştır. Test çözeltilerinin iki farklı günde yapılan analiz sonuçlarının % RSD değeri hesaplanmıştır.

### 3.6.8. Duyarlılık

Geliştirilen selekoksib miktar tayini yönteminde, analitik yönteminin duyarlılık parametresinin değerlendirilmesi için teşhis sınırı (*Limit of Detection*, LOD) ve tayin sınırı (*Limit of Quantitation*, LOQ) değerleri hesaplanmıştır. Teşhis sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ), sinyal/gürültü (S/G) oranının sırasıyla 3 ve 10 olduğu konsantrasyonlar olarak saptanmıştır.

### 3.6.9. Stabilite

Selekoksisib çözeltilerinin çözelti stabilitesinin belirlenebilmesi için  $200 \mu\text{g/mL}$  konsantrasyonda, üç tekrarlı standart ve test çözeltileri hazırlanmış, örnekler hazırlandıktan hemen sonra, 24. saatte ve 48. saatte analiz edilmiştir.

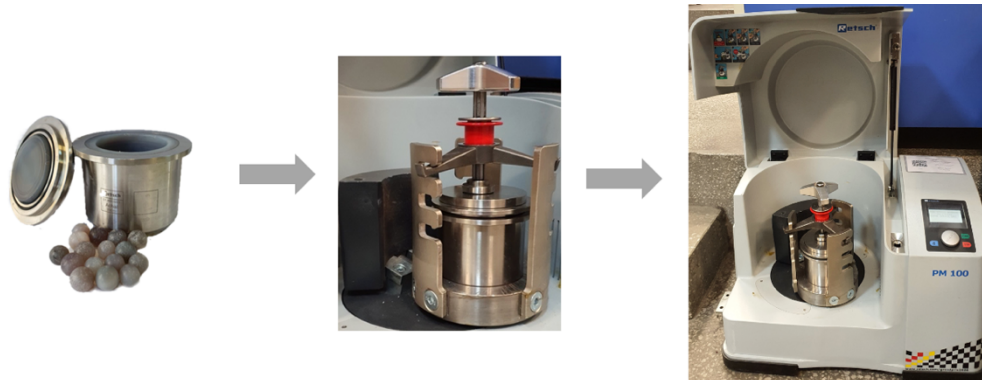
### 3.6.10. Filtre Seçim Çalışması

Çözücü olarak seyreltme çözeltileri kullanılarak hazırlanan standart ve test çözeltilerinin analizler öncesi partiküllerinden arındırılması amacıyla süzme işlemi yapılmıştır. Tez kapsamındaki çalışmalarda, selekoksisib ile kimyasal olarak geçimli olan ve selekoksisibin adsorbe olmadığı bir filtre materyali belirleyebilmek amacıyla

filtre çalışması yapılmıştır. Bu kapsamda literatürde yer alan Andrej ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma referans alınarak PTFE filtre seçilmiştir (146). 200 µg/mL konsantrasyonda standart ve test çözeltileri süzülmeden ve 0,45 µm hidrofilik PTFE filtreden süzülerek analiz edilmiştir. Örneklerin her birinden altışar enjeksiyon yapılmıştır ve süzülme-süzülen enjeksiyonlardan elde edilen pik alanları arasındaki uyum (%) hesaplanmıştır.

### 3.7. Mikronaltı/Nano-boyutta Selekoksib Bileşimlerinin Hazırlanması

Mikronaltı/nano-boyutta selekoksib bileşimleri, birlikte kuru öğütme yöntemi ile hazırlanmıştır. Kuru öğütme işleminde gezegen hareketli bilyalı değirmen (Planetary Ball Mills PM 100, Retsch, Haan, Almanya) kullanılmıştır. Selekoksib ve öğütme bileşiminde yer alan maddeler 1 mm gözenek açıklığına sahip elekten geçirilmiş, geometrik seyreltme yöntemi ile silindirik bir karıştırma kabında 10 dakika karıştırılmıştır. Öğütme işlemi için hazırlanmış olan toz karışımı iç yüzeyi agat kaplı 250 mL'lik öğütme haznesine yüklenmiş, 16 mm çapında (yapılan denemeler sonucunda en uygun bilya boyutu 16 mm olarak belirlenmiştir), agat bilyalar öğütme haznesine eklenmiştir. Öğütme haznesi gezegen hareketli bilyalı değirmene yerleştirilmiş, öğütme hızı ve öğütme süresi parametreleri ayarlanarak kuru öğütme başlatılmıştır. Öğütme işlemi süresinde sıcaklık kontrolü yapılmamıştır. Öğütme işlemi sonucunda elde edilen öğütülmüş partiküller daha sonra kullanılmak amacıyla amber renkli cam kap içerisinde desikatörde 25°C sıcaklıkta saklanmıştır. Selekoksib bileşimlerinin üretildiği gezegen hareketli bilyalı değirmene ilişkin görseller Şekil 3.1.'de verilmiştir.



**Şekil 3.1.** Mikronaltı/Nano-boyutta selekoksib bileşimlerinin üretildiği gezegen hareketli bilyalı değirmen.

### 3.8. Ön Tarama Çalışmaları

Mikronaltı/nano-boyutta selekoksib bileşimlerinin elde edilebilmesi ve selekoksibin çözünürlüğünün arttırılabilmesi için ilk olarak farklı fizikokimyasal özelliklere sahip yardımcı maddeler ile ön tarama deneyleri yapılmıştır. Ön tarama deneylerinde kullanılan yardımcı maddeler ve bu yardımcı maddelerin ağırlık oranları Tablo 3.4.'te verilmiştir. Öğütülecek toplam toz karışımı her bir formülasyon için 9,7 gram olacak şekilde sabit tutulmuş ve öğütme bileşiminde yer alacak maddelerin miktarları Tablo 3.4.'te verilen ağırlık oranlarına göre hesaplanmıştır. Selekoksib ve öğütme bileşiminde yer alan maddeler 1 mm gözenek açıklığına sahip elekten geçirilmiş, geometrik seyreltme yöntemi ile silindirik bir karıştırma kabında 10 dakika karıştırılmıştır. Öğütme işlemi için hazırlanmış olan toz karışımı iç yüzeyi agat kaplı 250 mL'lik öğütme haznesine yüklenmiş, 9 adet 16 mm çapında, agat bilyalar öğütme haznesine eklenmiştir. 9,7 gram toz ve 9 adet 16 mm agat bilyaların kullanılması ile bilya:toz ağırlık oranı 15:1 olarak sabit tutulmuştur. Öğütme haznesi gezegen hareketli bilyalı değirmene yerleştirilmiş, 500 devir/dakika öğütme hızında, her 30 dakikada bir 10 dakika duraklama yapılarak toplamda 4 saat öğütme yapılmıştır. Öğütme işlemi sonucunda elde edilen öğütülmüş partiküller daha sonra kullanılmak amacıyla amber renkli cam kap içerisinde desikatörde 25°C sıcaklıkta saklanmıştır.

**Tablo 3.4.** Ön tarama deneylerinde kullanılan yardımcı maddeler ve selekoksib:yardımcı madde ağırlık oranları.

Formülasyon Kodu	Birlikte Öğütme Kompozisyonu	Selekoksib: Yardımcı Madde Ağırlık Oranları
F01	CXB	1
F02	CXB:SLS	1:0.2
F03	CXB:PVP K12	1:1
F04	CXB:PVP K12:SLS	1:1:0.2
F05	CXB:PVP K30	1:1
F06	CXB:PVP K90	1:1
F07	CXB:LHPC LH 21	1:2
F08	CXB:HEC	1:2
F09	CXB:HEC:SLS	1:2:0.2
F10	CXB:HEC:PS40	1:2:0.2
F11	CXB:HEC:SLS:PS40	1:2:0.2:0.2
F12	CXB:LAC	1:2
F13	CXB:LAC:SLS	1:2:0.2
F14	CXB:LAC:SLS:PS40	1:8.6:0.2:0.2
F15	CXB:MAS	1:5
F16	CXB:PVP-VA	2:1
F17	CXB:PVP-VA:SLS	2:1
F18	CXB:SOL	1:1
F19	CXB:MAN	1:1
F20	CXB:PVP:MAN	1:1:1
F21	CXB:PVP:MAN:SLS	1:1.5:0.5:0.2
F22	CXB:PVP:MAN:SLS	1:0.5:1.5:0.2

CXB: selekoksib, SLS: sodyum lauril sülfat, PVP: polivinilpirolidon, L-HPC LH-21: düşük süstitüeli hidroksipropil selüloz, HEC: hidroksietil selüloz, PS40: polioksil 40 stearat, LAC: laktoz monohidrat, MAS: magnezyum alüminyum silikat, PVP-VA: vinilpirilidon ve vinil asetat kopolimer, SOL: Soluplus<sup>®</sup>, MAN: Mannitol.

### 3.9. Risk Faktörlerinin Belirlenmesi: Balık Kılıcı (Ishikawa) Diyagramı

Tez çalışmaları kapsamında kullanılan birlikte kuru öğütme yöntemi, selekoksibin partikül büyüklüğünü küçülterek mikronaltı/nano-boyutta selekoksib bileşimleri hazırlamak (9, 46) ve selekoksib katı dispersiyonları (55, 59, 77, 147) hazırlamak amacıyla kullanılmıştır. Birlikte kuru öğütme işlemi için kullanılan gezegen hareketli bilyalı değermenin çalışma ilkesi dikkate alındığında; öğütme hızı,

öğütme süresi, bilya boyutu, toz miktarı, bilya:toz ağırlık oranı öğütme işleminin etkinliği için önemli parametrelerdir (30, 34, 46). Öğütme bileşiminde yer alan selekoksib ve yardımcı maddelerin özellikleri ve miktarları formülasyon açısından potansiyel risklerdir. Mikronaltı/nano-boyutta selekoksib partiküllerinin kritik kalite özelliklerini etkileyebilecek formülasyon ve üretim işlemi parametrelerini belirleyebilmek, bu parametrelerin potansiyel risk değerlendirmesini yapabilmek amacıyla Ishikawa diyagramı oluşturulmuştur. Ön tarama deneylerinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda çözünürlük, partikül büyüklüğü ve intrinsik çözünme hızı özelliklerinin selekoksibin farmakokinetik parametrelerini doğrudan etkileyeceği düşünüldüğünden bu özellikler kritik kalite özellikleri olarak belirlenmiştir. Oluşturulan Ishikawa diyagramı ile yapılan potansiyel risk değerlendirmesi sonucunda belirlenen formülasyon ve üretim işlemi parametreleri daha sonraki çalışmalara dahil edilmiştir.

### 3.10. Plackett-Burman Deney Tasarımı

Mikronaltı/nano-boyutta selekoksib bileşimlerinin kritik kalite özelliklerini etkileyebileceği öngörülen formülasyon ve üretim işlemi parametrelerinin etkilerini değerlendirebilmek için Plackett-Burman deney tasarımı kullanılarak tarama çalışmaları yapılmıştır. Öğütme süresi, öğütme hızı ve bilya:toz ağırlık oranı kuru öğütme üretim yöntemi için bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. Öğütme bileşiminde yer alan selekoksib ağırlığının; sırasıyla polivinilpirolidon (PVP), mannitol (MAN) ve sodyum lauril sülfatın (SLS) ağırlığına oranı formülasyon bileşimi için bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. Bağımsız değişkenlerin alt ve üst düzeyleri ön tarama deneylerine ilişkin sonuçlar doğrultusunda belirlenmiştir. Kuru öğütme işlemi, ön tarama deneyleri ile benzer olacak şekilde gezegen hareketli bilyalı değirmen kullanılarak yapılmıştır. Çalışmada 16 mm çapında agat bilyalar kullanılmış, 250 mL öğütme haznesi için optimum doluluk oranını sağlayan 9,7 gram toz ağırlığı her formülasyon için sabit olacak şekilde çalışılmıştır. Öğütme işlemi sürecince sıcaklık kontrolü yapılmamış, 4 saatlik öğütme süresi boyunca her 30 dakika bir 10 dakika duraklama yapılmış; 1 saatlik öğütme süresince ise öğütme kesintisiz olarak devam ettirilmiştir. Mikronaltı/nano-boyutta selekoksib bileşimlerinin istenen özelliklerini etkileyeceği öngörülen 6 bağımsız değişkenin 4 yanıt değişkeni

üzerindeki etkisini belirleyebilmek için 12 deneyle, 0 merkez noktalı bir Plackett-Burman deney tasarım matrisi kullanılmıştır. Seçilen değişkenler ve düzeyleri Tablo 3.5.'te verilmiştir. 12 formülasyon hazırlanmış; her bir formülasyonun, partikül büyüklüğü (Y<sub>1</sub>), pH 12'de 30. dakikada çözünmüş selekoksib miktarı (Y<sub>2</sub>), pH 1,2+%0.2 SLS'de 120. dakikada çözünmüş selekoksib miktarı (Y<sub>3</sub>) ve sudaki çözünürlük (Y<sub>4</sub>) yanıt değişkenleri üzerindeki etkisi kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir.

**Tablo 3.5.** Plackett-Burman deney tasarımında kullanılan değişkenler ve düzeyleri.

Bağımsız Değişkenler		Tasarım Düzeyleri			
		Alt Düzey		Üst Düzey	
Kod	Gerçek Parametreler	Kodlanmış Değer	Gerçek Değer	Kodlanmış Değer	Gerçek Değer
X <sub>1</sub>	Öğütme hızı (devir/dk)	-1	250	+1	500
X <sub>2</sub>	Öğütme süresi (saat)	-1	1	+1	4
X <sub>3</sub>	Bilya:toz ağırlık oranı	-1	15	+1	5
X <sub>4</sub>	PVP:CXB ağırlık oranı	-1	0,5	+1	1,5
X <sub>5</sub>	SLS:CXB ağırlık oranı	-1	0	+1	0,2
X <sub>6</sub>	MAN:CXB ağırlık oranı	-1	0,5	+1	1,5

Deney matrisinin oluşturulması, randomizasyonu ve istatistiksel analizler için Minitab® 19 (Minitab Inc.; State College, PA, ABD) yazılımı kullanılmıştır (Tablo 3.6.). Modelin anlamlılığını ve faktör katsayılarını test etmek için çoklu doğrusal regresyon analizleri ve varyans (ANOVA) analizi yapılmıştır.

**Tablo 3.6.** Plackett-Burman deney tasarımı matrisi (etken sayısı: 6, deney sayısı:12).

Çalışma Sırası	Formülasyon Kodu	Bağımsız Değişkenler					
		X <sub>1</sub> (devir/dk)	X <sub>2</sub> (saat)	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>
1	PB01	250	1	5	0,5	0	0,5
2	PB02	500	4	5	1,5	0	0,5
3	PB03	500	1	15	1,5	0	1,5
4	PB04	250	4	5	0,5	0	1,5
5	PB05	250	1	15	1,5	0,2	0,5
6	PB06	500	4	15	0,5	0,2	1,5
7	PB07	250	4	15	1,5	0	1,5
8	PB08	250	1	5	1,5	0,2	1,5
9	PB09	500	1	15	0,5	0	0,5
10	PB10	250	4	15	0,5	0,2	0,5
11	PB11	500	4	5	1,5	0,2	0,5
12	PB12	500	1	5	0,5	0,2	1,5

### 3.11. Mikronaltı/Nano Boyutta Selekoksisib Bileşimlerinin Optimizasyonu: Merkezi Kompozit (*Central Composite*) Deney Tasarımı

Mikronaltı/nano-boyutta selekoksisib bileşimlerinin kritik kalite özelliklerini etkileyen bağımsız değişkenlerin taranması amacıyla uygulanan Plackett-Burman deney tasarımı ile istatistiksel olarak anlamlı değişkenler seçilmiştir. Selekoksisibin pH 12 ve pH 1,2+±0,2 SLS çözünme ortamında maksimum çözünmüş selekoksisib miktarın elde edilmesini sağlayacak en anlamlı 3 bağımsız değişken seçilmiş, bu değişkenlerin optimum değerini belirleyebilmek amacıyla optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Mikronaltı/nano-boyutta selekoksisib bileşimlerinin optimizasyonu için 3 etkenli, 5 düzeyli bir merkezi kompozit cevap yüzey deney tasarımı kullanılmıştır. Yanıt değişkenleri etkileyen en önemli bağımsız değişkenler (etkenler); PVP:CXB ağırlık oranı (X<sub>1</sub>), SLS:CXB ağırlık oranı (X<sub>2</sub>) ve MAN:CXB ağırlık oranı (X<sub>3</sub>) olarak seçilmiştir. Düşük ve yüksek değişken düzeyleri, Plackett-Burman deney tasarımından doğrudan alınmış, orta düzeyler, düşük ve yüksek düzeylerin orta noktası olarak belirlenmiştir. Merkezi kompozit deney tasarımında ortogonal olarak bloke edilen iki blok tasarımı kullanılmış, bu sayede model değişkenlerinin ve blok etkilerinin



bağımsız olarak tahmin edilebilmesi, regresyon katsayılarındaki değişimin en aza indirilmesi ve modelin kesinliğinin artırılması hedeflenmiştir. Ortogonal bir merkezi kompozit deney tasarımında, her eksen noktasının (yıldız noktası olarak da adlandırılır) merkezden uzaklığını ifade eden alfa ( $\alpha$ ) değeri 1,633 olduğu için deney tasarımında değişkenlerin en düşük ve en yüksek düzeyleri 1,633 olan alfa ( $\alpha$ ) değeri ile hesaplanmıştır (Tablo 3.7.).

**Tablo 3.7.** Merkezi Kompozit deney tasarımında kullanılan değişkenler ve düzeyleri.

Bağımsız Değişkenler		Tasarım Düzeyleri	
Kod	Gerçek Parametreler	Kodlanmış Değer	Gerçek Değer
X <sub>1</sub>	PVP:CXB ağırlık oranı	-1,633	0,1835
		-1	0,5
		0	1
		+1	1,5
		+1,633	1,8165
X <sub>2</sub>	SLS:CXB ağırlık oranı	-1,633	-0,0633
		-1	0
		0	0,1
		+1	0,2
		+1,633	0,2633
X <sub>3</sub>	MAN:CXB ağırlık oranı	-1,633	0,1835
		-1	0,5
		0	1
		+1	1,5
		+1,633	1,8165

Plackett-Burman deney tasarımı kapsamında değerlendirilen ancak etkileri istatistiksel olarak anlamlı bulunmayan, Y<sub>2</sub> ve Y<sub>3</sub> yanıt değişkenleri için eş zamanlı olarak anlamlı olmayan 3 değişkenin merkezi kompozit deney tasarımında kullanılan sabit düzeyleri Tablo 3.8.'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.8.** Merkezi kompozit deney tasarımında sabit düzeyde kullanılan değişkenler.

Değişkenler	Düzyey
Öğütme hızı (devir/dk)	250
Öğütme süresi (saat)	1
Bilya:toz ağırlık oranı	15:1

Deney matrisinin oluşturulması, randomizasyonu, veri işleme, istatistiksel analizler ve cevap yüzey grafiklerinin oluşturulması için Design Expert® 13 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, ABD) yazılımı kullanılmıştır. 8 küp noktası, küpte 4 merkez noktası, 6 eksen noktası ve eksenelde 2 merkez noktası içeren Design Expert® 13 yazılımı ile oluşturulan merkezi kompozit tasarım matrisinde 20 deneysel çalışma yer almıştır (Tablo 3.9.). Deney tasarımının önerdiği 20 formülasyon, bölüm 3.10.'da belirtilen üretim basamakları uygulanarak ve Tablo 3.8.'de verilen işlem parametreleri kullanılarak hazırlanmıştır. Her bir formülasyonun, pH 12'de 30. dakikada çözünmüş selekoksib miktarı ( $Y_1$ ) ve pH 1,2+%0,2 SLS'de 120. dakikada çözünmüş selekoksib miktarı ( $Y_2$ ) yanıt değişkenleri üzerindeki etkisi kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir.

**Tablo 3.9.** Merkezi kompozit deney tasarım matrisi (etken sayısı: 3, deney sayısı:20).

Çalışma Sırası	Formülasyon Kodu	Bloklar	Bağımsız Değişkenler		
			$X_1$	$X_2$	$X_3$
1	CC01	2	1	0,1	1
2	CC02	2	1	-0,0633	1
3	CC03	2	1	0,1	0,1835
4	CC04	2	1	0,1	1
5	CC05	2	0,1835	0,1	1
6	CC06	2	1	0,1	1,8165
7	CC07	2	1	0,2633	1
8	CC08	2	1,8165	0,1	1
9	CC09	1	1	0,1	1
10	CC10	1	1	0,1	1
11	CC11	1	1,5	0,2	0,5
12	CC12	1	0,5	0,2	0,5
13	CC13	1	1,5	0	0,5
14	CC14	1	1	0,1	1
15	CC15	1	0,5	0	1,5
16	CC16	1	1,5	0,2	1,5
17	CC17	1	1,5	0	1,5
18	CC18	1	0,5	0	0,5
19	CC19	1	1	0,1	1
20	CC20	1	0,5	0,2	1,5

Merkezi kompozit deney tasarımına ilişkin modelin doğrulamasını yapmak ve optimum birlikte öğütülmüş selekoksib bileşimini belirlemek için cevap yüzey modeli tarafından sunulan üç farklı deney yapılmıştır. Yanıtların tahmin edilen ve gerçek değerleri arasındaki ilişkilerini değerlendirmek için formülasyonlar hazırlanmış, hazırlanan formülasyonların intrinsik çözünme hızı testleri yapılarak selekoksib bileşimleri, çözünme hızı yönünden karakterize edilmiştir.

### **3.12. Mikronaltı/Nano-boyutta Selekoksib Bileşimlerinin Optimizasyonu: Bayes Optimizasyonu**

Mikronaltı/nano-boyuttaki selekoksib bileşimlerinin, birlikte kuru öğütme yöntemi ile hazırlanması için tasarımla kalite yaklaşımı uygulanmıştır. Tarama çalışmaları için Plackett-Burman deney tasarımı, optimizasyon çalışmaları için merkezi kompozit deney tasarımı kullanılmıştır. Hedef ürün özelliklerinin sağlanması için bağımsız değişkenlere ilişkin optimum düzeylerin, merkezi kompozit deney tasarımı (CCD) ve Bayes optimizasyon (BO) deney tasarımı ile belirlenmesi hedeflenmiştir. CCD ve BO tarafından önerilen deney tasarım matrisleri karşılaştırılmıştır. BO yöntemi, farmasötik geliştirme çalışmalarında henüz yeni uygulanmaya başlanmasına rağmen; optimizasyon performansı ve daha az maliyetli deney tasarımı için önemli üstünlükler sunmaktadır. Daha önceki farmasötik geliştirme çalışmalarında BO sadece bir sayısal model tarafından üretilen sanal deneylerle karşılaştırılmıştır (92). Tez çalışmamızda ise BO'nun önerdiği deneyler yapılmıştır, bu nedenle gerçek deneylerin farmasötik geliştirme çalışmalarında kullanılması açısından çalışmamız yenilik içermektedir.

BO için R istatistiksel yazılımındaki MLRMBO paketi kullanılmıştır (148). BO için vekil model olarak kovaryans fonksiyonu Matern 3/2 olan bir GP kullanılmıştır. Bu vekil model, merkezi kompozit deney tasarımında yapılan 8 deney kullanılarak başlatılmıştır (Tablo 3.10.). Merkezi kompozit deney tasarımının yanıt değişkenlerinden  $Y_2$ 'nin, selekoksibin fizyolojik ortamdaki çözünme hızı açısından  $Y_1$ 'den kritik olması nedeniyle  $Y_2$ 'ye ilişkin deney sonuçları kullanılmıştır. Deney sonuçlarının belirsizlik/gürültü içerebileceği varsayılmıştır.

**Tablo 3.10.** Gauss Süreci (*Gauss Process-GP*) vekil modelini başlatma deneyleri.

Bağımsız Değişkenler			Yanıt Değişken
X <sub>1</sub> (PVP:CXB ağırlık oranı)	X <sub>2</sub> (SLS:CXB ağırlık oranı)	X <sub>3</sub> (MAN:CXB ağırlık oranı)	Y <sub>2</sub> (pH 1,2'de 120.dakikada çözülmüş selekoksib miktarı, mg/500 mL)
1	0,1	1	20,00
1	0,1	1	27,50
1,5	0,2	0,5	42,70
0,5	0,2	0,5	5,00
1,5	0	0,5	1,70
1	0,1	1	30,00
0,5	0	1,5	1,20
1,5	0,2	1,5	42,30

BO'da kullanılan formülasyon değişkenlerinden PVP:CXB ve MAN: CXB için 0,5-2,0 aralığında, SLS:CXB için ise 0-0,2 aralığında taramalar yapılmıştır. Optimize edilecek olan çıktı değeri, pH 1,2'de 120. dakikada çözülmüş selekoksib miktarı olarak belirlenmiştir. BO deney tasarımında amaç, çözülmüş selekoksib miktarının maksimum değerde olmasını sağlamak olmuştur.

Cevap yüzey tasarımında, bağımsız değişkenlerin ve bu değişkenlere ilişkin düzeylerin belirlenmesinin ardından deney matrisi oluşturulur, tasarımın önerdiği sayıda deney yapılır. BO'da ise cevap yüzey tasarımının aksine, hangi deneylerin yapılacağı deneylerin başında belirlenmez; deney sürecinde önceki deney sonuçlarına göre yinelemeli olarak belirlenir. BO deney sürecinin her yinelemesinde vekil modelden Beklenen İyileştirme (EI) ve Güven Sınırı (CB) edinme fonksiyonları kullanılarak 2 deney için girdi önerisi alınmış, bu deneyler yapılarak deney sonuçları ile vekil model güncellenmiştir.

Her yinelemede iki deney önerisi alınmasının sebebi, deneylerin ikiye ikiye yapılmasının oluşturduğu maliyetin, birer birer yapılmasına göre daha düşük olmasıdır. BO'nun yinelemeli süreci, merkezi kompozit deney tasarımı ile aynı sayıda deney olmasını sağlamak için başlatma deneyleri de dahil olmak üzere toplam 20 deneye ulaşıldığında durdurulmuştur. BO tarafından önerilen kümülatif deney tasarım matrisi Tablo 3.11.'de verilmiştir. BO deney tasarımının önerdiği 12 formülasyon,

bölüm 3.10.'da belirtilen üretim basamakları uygulanarak ve Tablo 3.8.'de verilen işlem parametreleri kullanılarak hazırlanmıştır. Her bir formülasyonun, pH 1,2'de 120. dakikada çözülmüş selekoksib miktarı ( $Y_2$ ) yanıt değişkeni üzerindeki etkisi kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiş, elde edilen sonuçlar merkezi kompozit deney tasarımı ile karşılaştırılmıştır.

**Tablo 3.11.** BO tarafından önerilen kümülatif deney tasarım matrisi.

Çalışma Sırası	Formülasyon Kodu	Bağımsız Değişkenler		
		$X_1$	$X_2$	$X_3$
1	BO01	1,23	0,14	0,79
2	BO02	1,92	0,02	0,64
3	BO03	0,81	0,19	1,13
4	BO04	1,63	0,15	1,04
5	BO05	1,44	0,16	0,9
6	BO06	1,55	0,05	1,28
7	BO07	1,99	0,175	0,81
8	BO08	1,56	0,156	0,85
9	BO09	1,85	0,16	1,95
10	BO10	1,7	0,16	0,9
11	BO11	1,9	0,16	1,2
12	BO12	2,0	0,14	0,5

### 3.13. Mikronaltı/Nano-boyutta Selekoksib Bileşimlerinin Karakterizasyonu

#### 3.13.1. Çözünürlük

Optimum birlikte öğütülmüş selekoksib bileşimi, bu bileşime ilişkin fiziksel karışımı, işlem görmemiş selekoksib ve referans ürün Celebrex® Kapsül için çözünürlük deneyleri yapılmıştır. Çözünürlüğün belirlenebilmesi için şişe çalkalama (*shake flask*) yöntemi kullanılmıştır (149). Her bir örnekten doygun çözelti hazırlayabilmek amacıyla aşırı miktarda (10 mg selekoksibe eşdeğer miktarda) selekoksib içeren örnek tartımı yapılmış ve tartılan maddeler, içerisinde 10 mL çözünme ortamı olan ependorf tüplere eklenmiştir. Tüpler 2 dakika vortekslendikten

sonra 37°C'deki su banyosuna yerleştirilmiş, 24 saat boyunca yatay çalkalayıcıda çalkalanmıştır. 24 saatin sonunda tüplerdeki örnekler 0,45 µm hidrofilik PTFE filtreden süzölmüş, ilk 2 mL atılmış ve kalan filtrat cam flakonlara aktarılmıştır. Filtrat içerisinde bulunan selekoksib miktarı valide edilen analitik yöntem kullanılarak tayin edilmiştir. Çözünürlük çalışmasında çözünme ortamı olarak saf su ve %0,2 SLS içeren pH 1,2; pH 4,5; pH 6,8 ortamları kullanılmıştır. Her örnek 3 tekrarlı hazırlanmıştır.

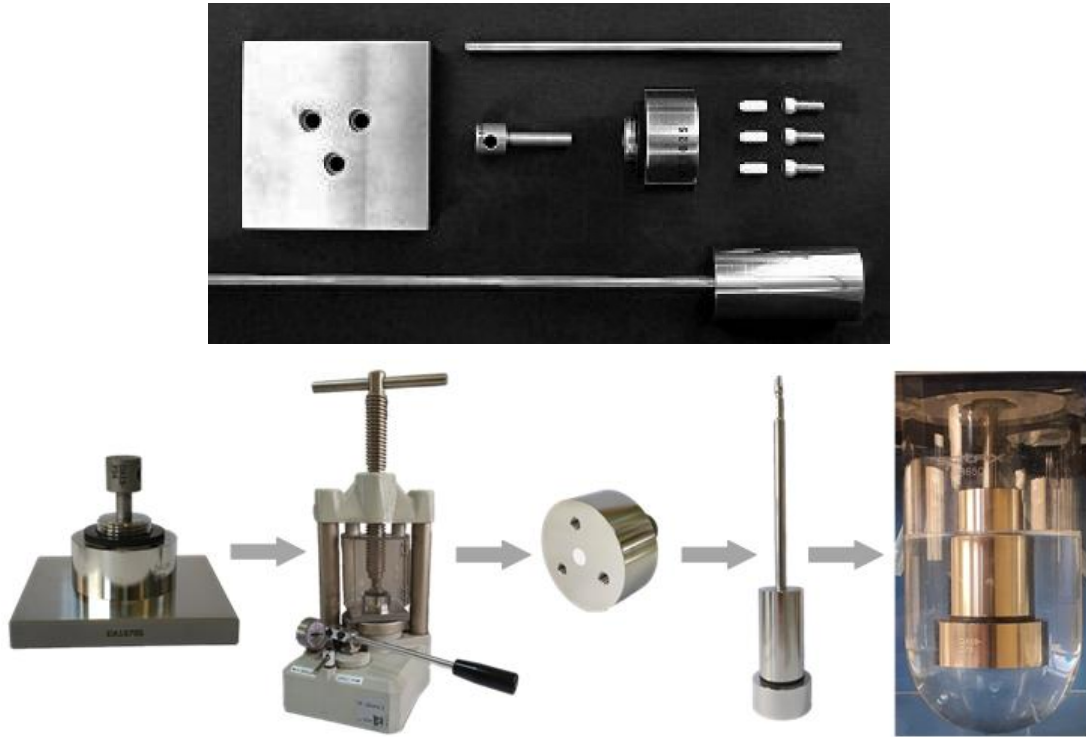
%0,2 oranında SLS içeren pH 1,2; pH 4,5 ve pH 6,8 ortamları aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

- **pH 1,2:** 8,3 mL %36-38'lik hidroklorik asit (konsantre) ve 2 gram SLS, 900 mL saf suya eklenmiş ve karıştırılmıştır. Çözelti hacmi 1000 mL'ye tamamlandıktan sonra pH değeri kontrol edilmiştir.
- **pH 4,5 0,05 M asetat tamponu:** 99 g sodyum asetat, 1,66 mL asetik asit ve 2 gram SLS, 900 mL saf suya eklenmiş ve karıştırılmıştır. Çözelti hacmi 1000 mL'ye tamamlandıktan sonra pH değeri kontrol edilmiştir. Gerekli olması durumunda sodyum hidroksit veya hidroklorik asit çözeltisi ile pH 4,5 olacak şekilde ayarlama yapılmıştır.
- **pH 6,8 fosfat tamponu:** 13,12 g dibazik sodyum fosfat heptahidrat, 7,04 g monobazik sodyum fosfat monohidrat ve 2 gram SLS, 900 mL saf suya eklenmiş ve karıştırılmıştır. Çözelti hacmi 1000 mL'ye tamamlandıktan sonra pH değeri kontrol edilmiştir. Gerekli olması durumunda sodyum hidroksit veya hidroklorik asit çözeltisi ile pH 6,8 olacak şekilde ayarlama yapılmıştır.

### 3.13.2. İntrensik Çözünme Hızı

Optimum birlikte öğütölmüş selekoksib bileşimi, bu bileşime ilişkin fiziksel karışım, işlem görmemiş selekoksib ve referans ürün Celebrex® Kapsül ürünlerinin çözünme akışı (*dissolution flux*), sabit yüzey alanından çözünme hızı tayini ile incelenmiştir. İntrensik çözünme hızı testinde yüzey alanı, sıcaklık, pH, karıştırma hızı ve çözünme ortamının iyonik gücü sabit tutulmuştur. İntrensik çözünme hızı testleri Sotax AT 7smart Dissolution Testing System (Sotax CH-4123, İsviçre) cihazı ve bu cihaza uyumlu Amerikan Farmakopesi kriterlerini sağlayan için USP Wood aygıtı kullanılarak yapılmıştır. Birim zamandaki tek değışiklik çözönmüş selekoksib miktarı

olacak şekilde deneyler tasarlanmıştır. Wood aygıtı bir tutucu mil (*holder*), bir sıkıştırma kalıbı (*compression die*), bir yüzey uç plakası (*surface end plate*), bir sızdırmazlık contası (*sealing gasket*) ve bir zımba (*punch*) içerir (Şekil 3.2.). Selekoksib bileşimlerinin %0,2 SLS içeren pH 1,2; pH 4,5; pH 6,8 çözünme ortamlarında; FaSSIF ve pH 12 ortamında intrinsik çözünme hızı testleri yapılmıştır. Selekoksibin tüm bu ortamlardaki çözünürlüğü birbirinden farklı olduğundan kullanılan etkin madde miktarı farklılık göstermiştir. Selekoksib, en yüksek çözünürlüğe pH 12 ortamında sahip olduğundan dolayı, bu çözünme ortamı için 100 mg selekoksib ve/veya selekoksibe eşdeğer miktarda bileşim kullanılmıştır. %0,2 SLS içeren pH 1,2; pH 4,5; pH 6,8 ve FASSIF çözünme ortamları için 50 mg selekoksib ve/veya selekoksibe eşdeğer miktarda öğütme bileşimi kullanılmıştır. Tartılan toz örnekleri yüzey uç plakasına sabitlenmiş sıkıştırma kalıbı içerisine yüklenmiştir ve üzerine zımba yerleştirilmiştir. Sıkıştırma kalıbı içerisindeki toz, 600 psi basınçta 30 saniye bekleme süresi uygulanarak hidrolitik pres ile sıkıştırılmıştır. Kullanılan zımbanın çapı 0,8 mm ve yüzey alanı 0,5 cm<sup>2</sup>'dir. Sıkıştırma kalıbı yüzey uç plakasından sökülmüş ve neopren malzemedan yapılmış sızdırmazlık contası takılı olan tutucu mile sabitlenmiştir. Tutucu mil, çözünme cihazına monte edilmiş, çözünme beheri içerisine yavaş bir şekilde indirilmiştir. Tutucu milin uzunluğu, çözünme yüzeyi ile çözünme beheri tabanı arasındaki mesafe 3 cm olacak şekilde ayarlanmıştır (Şekil 3.2.). İntrinsik çözünme hızı testi deney koşullarına ilişkin bilgiler Tablo 3.12.'de ayrıntılı bir şekilde verilmiştir. Belirtilen deney koşulları doğrultusunda her bir örnekleme zamanında cam pipet ile çözünme ortamından 5 mL örnek çekilmiştir. Toplam çözünme hacmini sabit tutabilmek için alınan her örnek için 5 mL taze ortam eklenmesi yapılmıştır. Alınan örnekler 0,45 µm hidrofilik PTFE filtreden süzülmüş, ilk 2 mL atılmış ve kalan filtrat cam flakonlara aktarılmıştır. Filtrat içerisinde bulunan selekoksib miktarı valide edilen analitik yöntem kullanılarak tespit edilmiştir. Her örnek 3 defa test edilmiştir.



**Şekil 3.2.** USP Wood aygıtı bileşenleri, örnek hazırlığı ve tutucu milin çözünme ortamındaki pozisyonu.

**Tablo 3.12.** İntrensik çözünme hızı deney koşulları.

Parametreler	Değerler				
	pH 1,2+%0,2 SLS	pH 4,5+%0,2 SLS	pH 6,8+%0,2 SLS	FASSIF	pH 12
Çözünme Ortam Hacmi (mL)	500	500	500	500	500
Çözünme Ortam Sıcaklığı (°C)	37±0,5°C	37±0,5°C	37±0,5°C	37±0,5°C	37±0,5°C
Karıştırma hızı (devir/dk)	200	200	200	200	100
Selekoksid Miktarı	50	50	50	50	100
Baskı kuvveti (psi)	600	600	600	600	600
Baskı süresi (s)	30	30	30	30	30
Örnekleme Zamanları (dk)	3, 6, 9, 12, 15, 30, 60 ve 120	3, 6, 9, 12, 15, 30, 60 ve 120	3, 6, 9, 12, 15, 30, 60 ve 120	15, 30, 60, 90 ve 120	1, 2, 3, 4, 5, 15, 30, 45, 60
Örnek Miktarı (mL)	5	5	5	5	5

%0,2 oranında SLS içeren pH 1,2; pH 4,5 ve pH 6,8 ortamları bölüm 3.13.1.'de anlatıldığı gibi, FASSIF ve pH 12 ortamları aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.



- **FASSIF çözünme ortamı**, 2,24 g FaSSIF/FeSSIF/FaSSGF bileşimi 500 mL tampon (pH 6,5; sodyum hidroksit, monobazik sodyum fosfat ve sodyum klorür içeren) çözeltisine eklenmiş ve karıştırılmıştır. Çözelti hacmi 1000 mL'ye tamamlandıktan sonra pH değeri kontrol edilmiştir
- **pH 12 0,04 M tribazik sodyum fosfat tamponu**: 15,2 g trisodyum fosfat dodekahidrat 900 mL saf suya eklenmiş ve karıştırılmıştır. Çözelti hacmi 1000 mL'ye tamamlandıktan sonra pH değeri kontrol edilmiştir. Gerekli olması durumunda sodyum hidroksit çözeltisi ile pH 12 olacak şekilde ayarlama yapılmıştır.

### 3.13.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)

İşlem görmemiş selekoksib, polivinilpirolidon, mannitol, sodyum lauril sülfat, optimum birlikte öğütülmüş selekoksib bileşimi, bu bileşime ilişkin fiziksel karışım örnekleri etkin madde ve yardımcı maddeler arasındaki olası fizikokimyasal geçimsizliklerin belirlenmesi ve birlikte kuru öğütme öncesi-sonrası selekoksibin fiziksel halinin değerlendirilmesi amacıyla diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC 3, Mettler Toledo, İsviçre) kullanılarak taramalar yapılmıştır. Yaklaşık olarak 5-8 mg aralığındaki örnek alüminyum pana alınarak hermetik olarak kapatılmıştır. Örnek içermeyen eşdeğer bir pan referans olarak kullanılmıştır. Örnekler 10°C/dk sıcaklık artışı (optimum birlikte öğütülmüş selekoksib bileşimi ve fiziksel karışım ile 5°C/dk ve 15°C/dk hızlarında da tarama yapılmıştır.) ile 25-250°C aralığında taranmıştır. Analizler sırasında 30 ml/dk akış hızında örneklerin üzerinden azot gazı geçirilerek olası bir oksidasyon oluşumu engellenmiştir. Analizler iki kez tekrar edilmiştir ve ölçüm sonuçları Star<sup>e</sup> Excellence (Mettler Toledo, İsviçre) yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

### 3.13.4. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Selekoksib ve öğütme bileşiminde yer alan maddelerin moleküler olarak tanıma analizini yapmak amacıyla işlem görmemiş selekoksib, polivinilpirolidon, mannitol, sodyum lauril sülfat, optimum birlikte öğütülmüş selekoksib bileşimi, bu bileşime ilişkin fiziksel karışım örneklerinin FTIR spektrumları incelenmiştir. FTIR analizi, Agilent Cary 630 FTIR spektrometresi (Agilent, ABD) ile 650 – 4000 cm<sup>-1</sup>

dalga sayısı aralığında,  $4 \text{ cm}^{-1}$  çözünürlükte yapılmış, her bir örnek için 3 tarama gerçekleştirilmiştir. Örnekler herhangi bir örnek hazırlama işlemine tabi tutulmadan, doğrudan analiz edilmiştir.

### 3.13.5. X-Işını Difraksiyonu (XRD)

Mikronaltı/nano-boyutta selekoksib bileşimlerinin elde edilebilmesi için uygulanan birlikte kuru öğütme yönteminin, kristal şeklindeki selekoksibin polimorfik yapısı üzerine etkisini inceleyebilmek için işlem görmemiş selekoksib, optimum birlikte öğütülmüş selekoksib bileşimi, bu bileşime ilişkin fiziksel karışım örneklerinin X-ışını difraksiyonu (X-ray diffraction, XRD) analizleri yapılmıştır. Analiz çalışmalarında Rigaku Ultima-IV Ray Diffractometer (Rigaku, Austin, TX, ABD) XRD cihazı kullanılmıştır. Örnekler herhangi bir örnek hazırlama işlemine tabi tutulmadan doğrudan analiz edilmiştir.  $3-35^\circ$  aralığında,  $1^\circ/\text{dk}$  tarama hızı kullanılarak ve  $0,02^\circ$  örnek genişliğinde ölçüm yapılmıştır. X-ışını kaynağı olarak Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ ) seçilmiş, gerilim 40 kV ve akım 30 mA olarak ayarlanmıştır. Yapılan ölçüm sonucu, XG Operation PINT 2200 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

### 3.13.6. Partikül Büyüklüğü

Optimum birlikte öğütülmüş selekoksib bileşimi içerisindeki selekoksib partiküllerinin ortalama partikül büyüklüğü (Z-ortalama) ve polidispersite indeksi (PDI), oda sıcaklığında bir Zetasizer Nano ZSP sistemi (Malvern Instruments, Malvern, Birleşik Krallık) kullanılarak dinamik ışık saçılımı (DLS) tekniği ile ölçülmüştür. 10 mg selekoksibe eşdeğer gerekli toz miktarı tartılmış, %0,1 polisorbata 80 içeren 10 mL saf suya ilave edilmiştir. Hazırlanan örnek ultrasonik prob (Bandelin, Almanya) ile 3 dakika homojenize edilmiş, ortalama partikül büyüklüğü ölçümü için katlanmış kapiler zeta hücresi (DTS1070) kullanılmıştır. Her örnek 3 defa ölçülmüştür. Bu işlemler işlem görmemiş selekoksib etkin maddesi, optimum birlikte öğütülmüş selekoksib bileşimine ilişkin fiziksel karışım ve Celebrix® Kapsül için de yapılmıştır.

### 3.13.7. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

Optimum birlikte öğütülmüş selekoksib bileşimi ve fiziksel karışım içerisindeki selekoksib partiküllerinin ortalama partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı ve morfolojisinin incelenmesi amacıyla taramalı elektron mikroskopisi çalışmaları Tescan GAIA FIB-SEM (Brno-Kohoutovice, Çek Cumhuriyeti) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Örnekler yapışkan karbon bant kullanılarak bir alüminyum tabla üzerine monte edilmiştir ve yüksek vakumlu bir buharlaştırıcıda bir argon atmosferi altında altınla kaplanmıştır.

### 3.13.8. Stabilité Çalışmaları

Optimum birlikte öğütülmüş selekoksib bileşiminin fizikokimyasal stabilitesini araştırmak ve tayin etmek amacıyla hızlandırılmış koşul ( $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/\%75 \pm \%5$  Bağıl Nem (BN)) ve uzun dönem koşulunda ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/\%60 \pm \%5$  BN) 3 ay süreli stabilite çalışmaları yapılmıştır. Stabilité çalışmalarında optimum birlikte öğütülmüş selekoksib bileşimi ve bu bileşime ilişkin fiziksel karışım örnekleri, her bir örnekleme zamanı için ayrı ayrı olacak şekilde cam şişelerde saklanmıştır. Stabilité çalışmalarına ilişkin deney tasarımı ve deney koşulları Tablo 3.13.'te verilmiştir.

**Tablo 3.13.** Hızlandırılmış koşul ve uzun dönem koşuluna ilişkin stabilite deney planı.

<b>Deney Koşulları</b>	<b>Hızlandırılmış Koşul</b> ( $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/\%75 \pm \%5$ BN)	<b>Uzun Dönem Koşulu</b> ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/\%60 \pm \%5$ BN)
Analiz Zamanları (ay)	0, 1, 2, 3	0, 3
Önek Adı	- Optimum birlikte öğütülmüş selekoksib bileşimi - Fiziksel karışım	- Optimum birlikte öğütülmüş selekoksib bileşimi - Fiziksel karışım
Fizikokimyasal Analizler	- Miktar Tayini - İntresik Çözünme Hızı - Ortalama partikül büyüklüğü - PDI - XRD	- Miktar Tayini - İntresik Çözünme Hızı - Ortalama partikül büyüklüğü - PDI - XRD

### 3.14. Mikronaltı/Nano Boyutta Selekoksib Bileşimleri ile Formülasyon Çalışmaları

Mikronaltı/nano-boyutta selekoksib partikülleri içeren bileşim ile formülasyon geliştirme çalışmaları yapılmıştır. Selokoksib, nispeten düşük toz yoğunluklarına ve istenmeyen toz akış özelliklerine sahip yapışkan bir maddedir (72). Bu özellikler, yüksek miktarda etkin maddenin, küçük boyutlu bir kapsüle doldurulmasını zorlaştırır. Bu nedenle piyasada yer alan Celebrex® Kapsül referans ürünü yaş granülasyon üretim yöntemi ile üretilmiştir (72). Ancak birlikte kuru öğütme işlemi sonunda elde edilen bileşimin toz akış özelliklerinin (görünür toz yoğunluğu: 0.41 g/mL sıkıştırılmış toz yoğunluğu: 0.50 g/mL, akış süresi: 15 saniye/100 gram, Hausner oranı: 1.21) doğrudan karışım ve kapsüle dolun işlemleri açısından uygun olması sayesinde yaş granülasyon yöntemine gereksinim duyulmamıştır. İşlem görmemiş selekoksib etkin maddesi ile referans ürün Celebrex® Kapsül ürününe eşdeğer bir formülasyon geliştirmek amacıyla tersine mühendislik (*reverse engineering*) uygulanmıştır. Referans ürün ile benzer şekilde yaş granülasyon yöntemi kullanılarak üretim yapılmış, yapılan çalışmalar sonucunda formülasyon bileşiminde yer alan yardımcı maddelerin kullanım miktarları belirlenmiştir. Belirlenen madde miktarları sabit tutularak birlikte kuru öğütme işlemi sonunda elde edilen selekoksib bileşimi etkin madde kaynağı olarak kullanılmıştır. Belirlenen optimum formülasyona ilişkin kalitatif ve kantitatif formül kullanılarak doğrudan karışım yöntemi ile üretim yapılmıştır.

### 3.15. Selekoksib Formülasyonları Çözünme Çalışmaları

Selekoksib formülasyonlarının çözünme testleri için kullanılan çözünme ortamları bölüm 3.13.1. ve 3.13.2.'de açıklandığı şekilde hazırlanmıştır. Hazırlık aşamasında %0,2 SLS oranına ek olarak %0,5 SLS içeren çözünme ortamları da hazırlanmıştır.

Optimum selekoksib formülasyonu ve referans ürün Celebrex® Kapsül ürününe ilişkin çözünme testleri, selekoksib kapsül için FDA tarafından belirtilen deney koşulları kullanılarak yapılmıştır. Çözünme çalışmalarında Sotax AT 7smart Dissolution Testing System (Sotax CH-4123, İsviçre) cihazı ve USP Apparatus II (pedal) aygıtı kullanılmıştır. Çözünme hacmi 1000 mL, karıştırma hızı 50 devir/dk, çözünme ortam sıcaklığı  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  olacak şekilde ayarlanmıştır. pH 1,2  $\pm 0,2$  ve

%0.5 SLS, pH 4,5 + %0,2 ve %0.5 SLS, pH 6,8 + %0,2 ve %0.5 SLS, pH 12 + %0,5 SLS çözünme ortamlarında yapılan çözünme testlerinde 10., 20., 30., 45. ve 60. dakikalarda cam pipet ile çözünme ortamından 5 mL örnek çekilmiştir. Toplam çözünme hacmini sabit tutabilmek için alınan her örnek için 5 mL taze ortam eklemesi yapılmıştır. Alınan örnekler 0,45 µm hidrofilik PTFE filtreden süzülüş, ilk 2 mL atılmış ve kalan filtrat cam flakonlara doldurulmuştur. Filtrat içerisinde bulunan selekoksib miktarı, valide edilen analitik yöntem kullanılarak tayin edilmiştir. Her örnek 6 defa test edilmiştir.

Çözünme çalışmalarında sink koşulun sağlandığı ve sağlanmadığı ortamlar oluşturulmuştur. 1000 mL çözünme ortamında sink koşulun sağlanması açısından bölüm 3.13.1.'de belirtilen çözünürlük çalışmasına ilişkin bulgular belirleyici olmuştur. Elde edilen çözünürlük verilerine göre 1000 mL'lik pH 1,2 + %0,2 SLS, pH 4,5 + %0,2 SLS, pH 6,8 + %0,2 SLS çözünme ortamlarında sink koşulun sağlanabilmesi için optimum formülasyondaki selekoksib miktarının 37 mg/kapsül, referans üründeki selekoksib miktarının ise 19 mg/kapsül olması gerektiği belirlenmiştir. Bu yitilikleri sağlayacak miktarda gerekli bitmiş ürün kapsüllere doldurulmuştur. Aynı zamanda piyasada var olan 200 mg yitiliğin çözünme profillerini inceleyebilmek için sink koşulun sağlanmadığı, test ve referans ürün için selekoksib miktarının 200 mg/kapsül olduğu ürünler hazırlanarak çözünme testleri yapılmıştır. Kapsüllerin çözünme ortamlarında yüzmesini engellemek amacıyla tel sarmallar (sinkerlar) kullanılmıştır. Yapılan çözünme çalışmalarında optimum formülasyonun ve referans ürünün çözünme profillerinin benzerliğini sayısal olarak ifade edebilmek için benzerlik faktörü ( $f_2$ ) değerleri hesaplanmıştır.

### **3.16. Selekoksib Formülasyonlarına İlişkin Hücre Kültürü Çalışmaları**

Hücre kültürü çalışmaları, işlem görmemiş selekoksib, optimum formülasyon, Celebrex® Kapsül ve optimum formülasyona ilişkin fiziksel karışımın sitotoksitesini ve geçirgenliğini araştırmak için yapılmıştır. Bu amaçla pasaj sayıları 22-26 arasında olan insan kolon kanseri hücre hattı (Caco-2 hücreleri) kullanılmıştır. Sitotoksite ve geçirgenlik testlerinde kullanılacak Caco-2 hücrelerinin çözünmesi, çoğaltılması ve pasajlanması için gerekli işlemler yapılmıştır.

-180°C’de muhafaza edilen Caco-2 hücreleri azot tankından alınarak kuru buza konulmuştur. Dondurulmuş Caco-2 hücrelerini içeren tüpler 37°C’lik su banyosunda çözündürülerek laminar akış kabininde, kültür ortamı üzerine hızlıca boşaltılmıştır. 2000 devir/dk’da 3 dk santrifüj edildikten sonra üstte kalan kısım atılmıştır. Çöken hücreler taze kültür ortamında (%10 fetal bovine serum (FBS) ve 2 mM L-glutamin, penisilin (50 U/mL) ve streptomisin (50 µg/mL) içeren Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM)) tekrar süspansiyon edilip 25 cm<sup>2</sup>’lik hücre kültürü kabına (flask) aktarılmıştır. Caco-2 hücreleri, 37°C’de nemlendirilmiş %5 CO<sub>2</sub> hücre kültür etüvünde tutulmuştur. Flasklar 37°C, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 BN ortamında inkübe edilerek pasajlama aşamasına kadar her iki günde bir kültür ortamı yenilenmiştir. Hücreler, yoğunlukları %80-90 oranına ulaştığında pasajlanmıştır.

Hücreleri kaldırmak için 1x tripsin- Etilendiamin Tetraasetik asit (EDTA) çözeltisi kullanılmıştır. Hücre kültür kaplarındaki (flask) kültür ortamı atıldıktan sonra hücreler pH 7,4 Phosphate buffered saline (PBS) ile bir kez yıkanmıştır. Daha sonra flasklar, tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 5 dk süreyle inkübatörde tutulmuştur. Tripsinin etkisini inhibe etmek için tripsin-EDTA içerisindeki hücre süspansiyonu bekleme süresi sonunda besleme ortamı içeren tüpe eklenmiştir. Hücre süspansiyonu 1:2 oranında pasajlanarak yeni kültür kaplarına alınmış, inkübatörde çoğalmaya bırakılmıştır.

### 3.16.1. Sitotoksisite Çalışmaları

İşlem görmemiş selekoksib, optimum formülasyon, Celebrex® Kapsül ve optimum formülasyona ilişkin fiziksel karışımın sitotoksisitesini belirlemek için Caco-2 hücre hattında (pasaj numarası: 22–26) tiazolil mavi tetrazolyum bromür (MTT) analizleri yapılmıştır. Hücreler, büyüme ortamında süspansiyon edilmiş ve 96 oyuklu plakalara 5 x 10<sup>3</sup> hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. 24 saat sonra, kuyucuklara farklı konsantrasyonlarda (1, 5, 10, 50, 100, 200, 500 ve 1000 µM) işlem görmemiş selekoksib, optimum formülasyon, Celebrex® Kapsül ve optimum formülasyona ilişkin fiziksel karışımından oluşan süspansiyon formunda örnekler eklenmiş, 4 saat ve 24 saat boyunca 37°C’de nemlendirilmiş %5 CO<sub>2</sub> hava atmosferinde inkübe edilmiştir (n=6). İnkübasyon süresinin ardından kuyucuklara 25 µL MTT (5 mg/mL) çözeltisi eklenmiş ve 37°C’de 4 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra besiyeri

uzaklaştırılmış ve formazan kristallerinin çözünmesi için kuyucuklara 200 µL DMSO eklenmiştir. Hücre canlılığının belirlenmesi için kuyucukların optik yoğunlukları bir mikropilaka okuyucu (VERSAmax Molecular Devices Corporation, Sunnyvale CA, ABD) ile 570 nm’de ölçülmüştür (%). % hücre canlılığı Eşitlik 3.2. kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \frac{\text{Absorbans}_{\text{Test Kuyucuğu}}}{\text{Absorbans}_{\text{Kontrol Kuyucuğu}}} \times 100 \quad (3.2.)$$

### 3.16.2. Permeabilite Çalışmaları

İşlem görmemiş selekoksib, optimum formülasyon, Celebrex® Kapsül ve optimum formülasyona ilişkin fiziksel karışımın geçirgenliğini tayin etmek için Caco-2 hücreleri kullanılmıştır. Pasaj sayısı 22-26 arasında olan Caco-2 hücre süspansiyonları 12 kuyucuklu (1,13 cm<sup>2</sup>) insertlere (0,4 µm) tripan mavisi ile sayım yapıldıktan sonra 1x10<sup>5</sup> hücre/cm<sup>2</sup> olacak şekilde ekilmiştir. Apikale 0,5 mL ve bazolaterale 1,5 mL büyüme ortamı eklenmiştir. Plakalar 37°C’de %5 CO<sub>2</sub> içeren nemli havada inkübe edilmiştir. Ortam 21 gün boyunca gün aşırı değiştirilmiştir. Kuluçka süresinin sonunda, Caco-2 hücre tek tabakasının bütünlüğü, Millicell-ERS voltmetresi (Millipore Sigma, Burlington, MA) kullanılarak Transepitelyal Elektrik Direnci (TEER) ölçülerek değerlendirilmiştir. TEER değeri 400–600 Ωcm<sup>2</sup> aralığına ulaştığında geçirgenlik çalışmalarına başlanmıştır.

Kültür ortamı, apikal ve bazolateral taraflarda 500 uL ve 1500 uL taşıma tamponu (TB) (10 mM HEPES (pH 7,4) içeren HBSS) ile değiştirilmiştir ve hücre tek tabakaları daha sonra 30 dakika boyunca 37°C’de inkübe edilmiştir. TB çıkarıldıktan sonra, işlem görmemiş selekoksib, optimum formülasyon, Celebrex® Kapsül ve optimum formülasyona ilişkin fiziksel karışım ile hazırlanan 5µM konsantrasyonundaki süspansiyon formunda örnekler 500 µL olarak apikal taraftaki her bir kuyucuğa eklenmiştir ve bazolateral taraf TB ile doldurulmuştur (n=3). Plakalar yatay bir çalkalayıcıya yerleştirilmiş, 60 devir/dk’da, 37°C’de 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan 2 saat sonra bazolateral taraftan (1,5 mL) izole edilmiş örneklerdeki selekoksib miktarı, valide edilen analitik yöntem kullanılarak tespit edilmiştir. Her örnek 3 defa test edilmiştir.

Görünen geçirgenlik katsayıları (Papp, cm/sn) Eşitlik 3.3. kullanılarak hesaplanmıştır.

$$P_{app} = \frac{\text{Transport hızı } \left(\frac{dQ}{dt}\right)}{\text{Hücre kültürü yüzey alanı (A)} \times \text{Başlangıç konsantrasyonu (C}_0\text{)}} \quad (3.3.)$$

### 3.17. Selekoksisib Formülasyonlarına İlişkin Farmakokinetik Çalışmalar

Optimum formülasyon ve Celebrex® Kapsül referans ürünün oral uygulama sonrası farmakokinetik bulgularının incelenmesi amacıyla hayvan deneyleri yapılmıştır. Optimum formülasyon ve referans ürün 10 mg/kg ve 40 mg/kg olmak üzere iki farklı dozda oral yoldan uygulanmıştır. Hayvan çalışma protokolü, Kobay Deney Hayvanları AŞ (No. 439) etik kurulu tarafından onaylanmıştır. Erkek Sprague Dawley (SD) sıçanları (vücut ağırlığı 280±20 g) Kobay Deney Hayvanları AŞ'den satın alınmıştır. Her bir kafeste 3 adet sıçan olacak şekilde, laminar akış altında, 1 hafta boyunca 22±2°C ve %50-60 BN'de bekletilmiştir. Sıçanlar, ilaç uygulamasından önce bir gece (14-18 saat) aç bırakılmış, sıçanların sadece su içmelerine izin verilmiştir. Sıçanlar dört gruba ayrılmıştır; birinci gruba 10 mg/kg Celebrex® Kapsül (n=8), ikinci gruba 10 mg/kg optimum formülasyon (n=8), üçüncü gruba 40 mg/kg Celebrex® Kapsül (n=6) ve dördüncü gruba 40 mg/kg optimum formülasyon (n=6) uygulanmıştır. Farmakokinetik çalışma tasarımı ilişkin bilgiler Tablo 3.14.'te verilmiştir.

Oral uygulama için Celebrex® Kapsül ve optimum formülasyonun 3 mg/2 mL selekoksisib konsantrasyonunda sudaki süspansiyonları hazırlanmıştır. Tartılan Celebrex® Kapsül ve optimum formülasyon bileşimleri saf suya eklenmiş 5 dk vortekslenerek homojen bir süspansiyon elde edilmiştir. Sıçanlara uygulanacak 10 mg/kg ve 40 mg/kg dozları için kaç mL süspansiyonun oral yoldan verilmesi gerektiğini hesaplamak amacıyla sıçanlar tartılmıştır. 300 gram ağırlığındaki sıçanlara 10 mg/kg dozunda selekoksisib uygulayabilmek amacıyla 3 mg/2 mL konsantrasyonundaki selekoksisib süspansiyonundan 2 mL; 40 mg/kg dozunda selekoksisib uygulayabilmek için 8 mL örnek enjektöre doldurulmuştur ve oral gavaj ile doğrudan sıçanın midesine ulaşması sağlanmıştır (Şekil 3.3.). İlaç uygulamasından önce ve ilaç uygulama sonrası 0,5; 1; 2; 3; 4; 6; 12 ve 24. saatlerde kuyruk veninden heparinize tüpe yaklaşık 0,5 mL kan örneği alınmıştır (Şekil 3.3.). Kan numuneleri,



laboratuvar koşulunda 10 dk boyunca 10.000 devir/dk hızda santrifüjlenmiştir. Plazma numuneleri analiz edilene kadar (yaklaşık 250 µL) -70 °C’de saklanmıştır.

**Tablo 3.14.** Optimum formülasyon ve referans ürünün oral farmakokinetik çalışmasına ilişkin deney tasarımı.

Dozaj Şekli	: Kapsül (oral gavaj ile verebilmek için suda süspande edilerek uygulanmıştır.)
Uygulama Yolu	: Oral (Oral gavaj ile)
Doz	: 10 mg/kg (2 mL süspansiyon) 40 mg/kg (8 mL süspansiyon)
Deney Hayvanı Türü	: Sprague Dawley (SD) rats (280±20 g)
Deney Hayvanı Sayısı	: Grup-1: 8 sıçan Grup-2: 8 sıçan Grup-3: 6 sıçan Grup-4: 6 sıçan
Çalışma Tipi	: Açlık (ilaç uygulama öncesi 14-18 saat)
Çalışma Tasarımı	: Tek doz, paralel tasarım
Çalışma Grupları	: Grup-1: 10 mg/kg Celebrex® Kapsül Grup-2: 10 mg/kg Optimum formülasyon Grup-3: 40 mg/kg Celebrex® Kapsül Grup-4: 40 mg/kg Optimum formülasyon
Kan Örnek Alımı	: Kuyruk veni
Kan Örneği Alım Zamanları	: İlaç uygulama öncesi (0) ve ilaç uygulama sonrası 0,5; 1; 2; 3; 4; 6; 12 ve 24. saat
Kan Örnek Miktarı	: 0,5 mL
Analit	: Plazmadaki selekoksib
Farmakokinetik Parametreler	: $C_{maks}$ $t_{maks}$ AUC $t_{1/2}$



**Şekil 3.3.** Sıçanlara oraj gavaj ile ilaç uygulaması (A) ve kuyruk veninden kan alım (B ve C) görselleri.

Plazma örneklerindeki selekoksib miktar tayini, literatürde yer alan sıvı kromatografisi–tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (150, 151). Bu amaçla -70 °C'den çıkarılan plazma örneklerinin oda sıcaklığına ulaşması beklendikten sonra 100 µL'lik bir kısmını analiz için ependorf tüpe aktarılmış ve her bir 100 µL plazma örneğinin üzerine 10 µL iç standart çözeltisi (20 ppm atorvastatin) ve 100 µL %0,1 formik asit içeren asetonitril eklenmiştir. Karışım 2 dakika vortekslenmiş ve 13.0000 rpm'de hızda 15 dakika santrifüjle proteinlerin çöktürülmesi sağlanmıştır. Santrifüj sonunda üstte kalan sıvı kısımdan 150 µL alınarak içerisinde cam insert olan cam flakonlara aktarılmış, LC-MS/MS (Shimadzu 8030, Japonya) sisteminde analiz edilmiştir.

Selekoksib ve iç standart olan atorvastatin ile sekiz farklı konsantrasyonda kalibrasyon çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler LC-MS/MS (Shimadzu 8030, Japonya) sisteminde analiz edilmiş, veriler LabSolutions (version 5.72, Shimadzu) yazılımı kullanılarak işlenmiştir.

### **Kalibrasyon Çözeltileri**

**Selekoksib stok çözelti (100 ppm):** 5 mg selekoksib çalışma standardı hareketli faz çözeltisinde çözdürülerek 50 mL'ye tamamlanmıştır.

**Selekoksib kalibrasyon çözeltileri:** Seleksoksib stok çözeltisinin hareketli faz ile seyreltilmesi sonucu 10; 5; 1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 ve 0,005 ppm konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlanmıştır.

**Atorvastatin stok çözelti (200 ppm):** 10 mg atorvastatin çalışma standardı hareketli faz çözeltisinde çözdürülerek 50 mL'ye tamamlanmıştır.

**Atorvastatin çözelti (20 ppm):** Atorvastatin stok çözeltisinin hareketli faz ile seyreltilmesi sonucu 20 ppm konsantrasyonunda çözelti hazırlanmıştır.

**Kalibrasyon çözeltileri:** 100 µL plazma (boş) üzerine selekoksib kalibrasyon çözeltilerinin her birinden 100 µL, 20 ppm atorvastatin çözeltisinden 10 µL eklenmiştir. Karışım 2 dakika vortekslenmiş ve 13.0000 rpm'de hızda 15 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda üstte kalan sıvı kısımdan 150 µL alınarak içerisinde cam insert olan cam flakonlara aktarılmıştır.

LC-MS/MS yöntemine ilişkin kromatografik ve MS/MS koşulları sırasıyla Tablo 3.15. ve Tablo 3.16.'da verilmiştir. Analizler, gradient elüsyon %0,1 formik asit

(A) ve %0,1 formik asit içeren asetonitril (B) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.15.).

**Tablo 3.15.** Selekoksib miktar tayini yöntemine ilişkin kromatografik koşullar.

Kolon	: C18; 350 mm x 2,1 mm, 3 µm
Akış Hızı	: 0.35 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	: 10 µL
Kolon Sıcaklığı	: 40°C
Örnek Sıcaklığı	: Oda sıcaklığı
Analiz Süresi	: 7 dk
Hareketli Faz	: A: %0,1 formik asit, B: %0,1 formik asit içeren asetonitril
Gradient elüsyon	Başlangıç: %70 hareketli faz A 1. dakika: %70 hareketli faz A 2. dakika % 30 hareketli faz A 4. dakika % 30 hareketli faz A 4,1. Dakika %70 hareketli faz A 7. dakika %70 hareketli faz A

**Tablo 3.16.** Selekoksib miktar tayini yöntemine ilişkin MS/MS dedeksiyon koşulları.

İyonizasyon modu	: Negatif
İyonizasyon voltajı	: 4,5 kV
Nebulizatör gaz akış hızı	: 3 mL/dk
Kurutma gazı akış hızı	: 15 L/dk
Desolvasyon hattı sıcaklığı	: 250°C
Isı bloğu sıcaklığı	: 400°C
Çoklu reaksiyon izleme (MRM)	: Selekoksib: 380,0 [M - H] <sup>-</sup> → 316,0 m/z İç standart: 557,20 [M - H] <sup>-</sup> → 397,1 m/z
Bekleme süresi	: 200 ms
Çarpışma enerjileri (CE)	: Selekoksib: 24 eV İç standart: 31 eV

## 4. BULGULAR

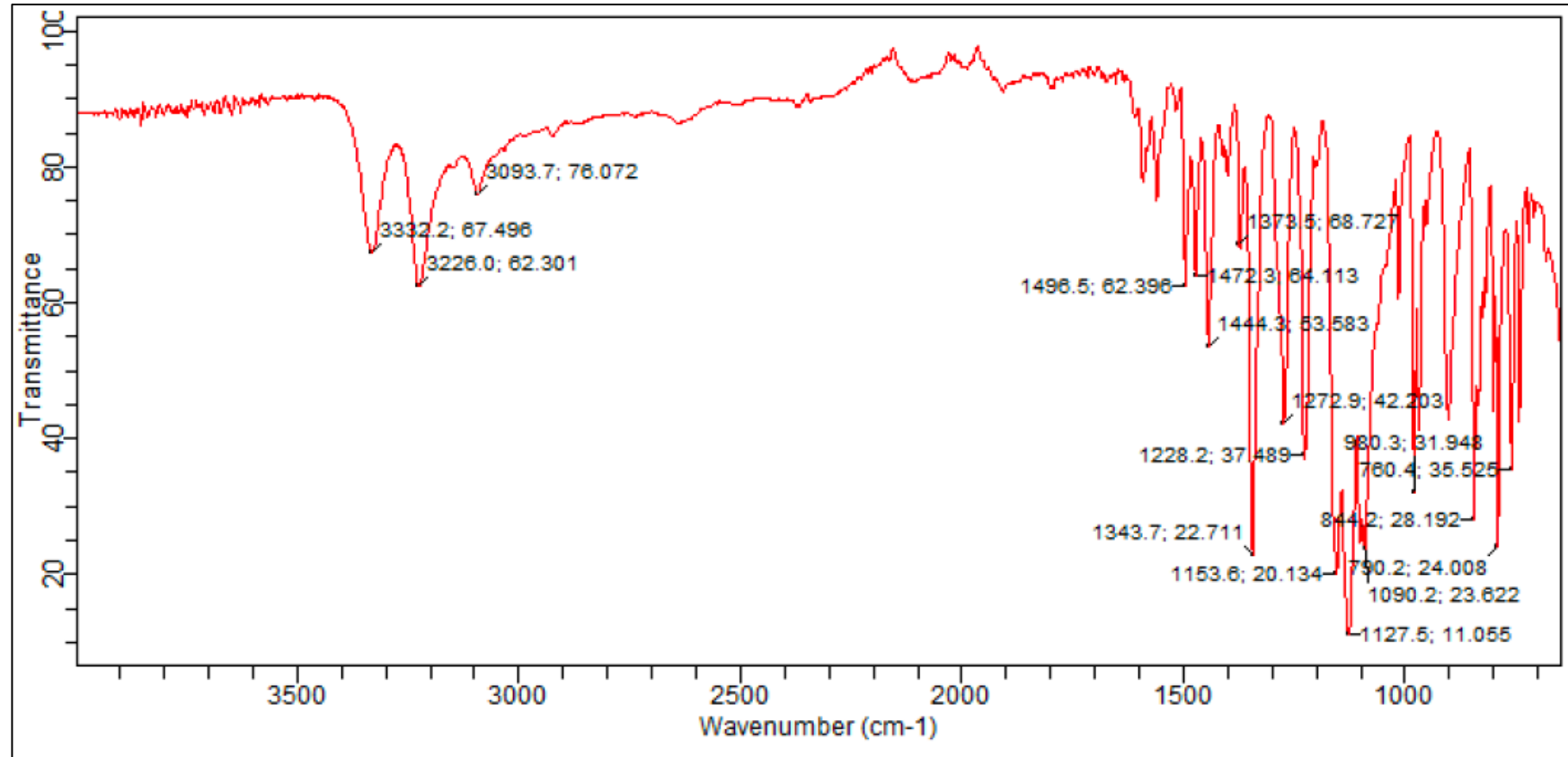
### 4.1. Selekoksibin Fizikokimyasal Karakterizasyon Çalışmaları

#### 4.1.1. Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

FTIR'dan elde edilen spektrumlar etkin madde üreticisinin etkin madde ana dosyasında belirttiği fonksiyonel kimyasal bağlara ilişkin gerilme titreşimleri kapsamında değerlendirilmiştir. FTIR spektrumunda gözlenen ve selekoksibe spesifik olan pikler Tablo 4.1.'de ve Şekil 4.1.'de verilmiştir (93).

**Tablo 4.1.** Selekoksib FTIR spektrumu üretici firma ve deneysel analiz sonuçları.

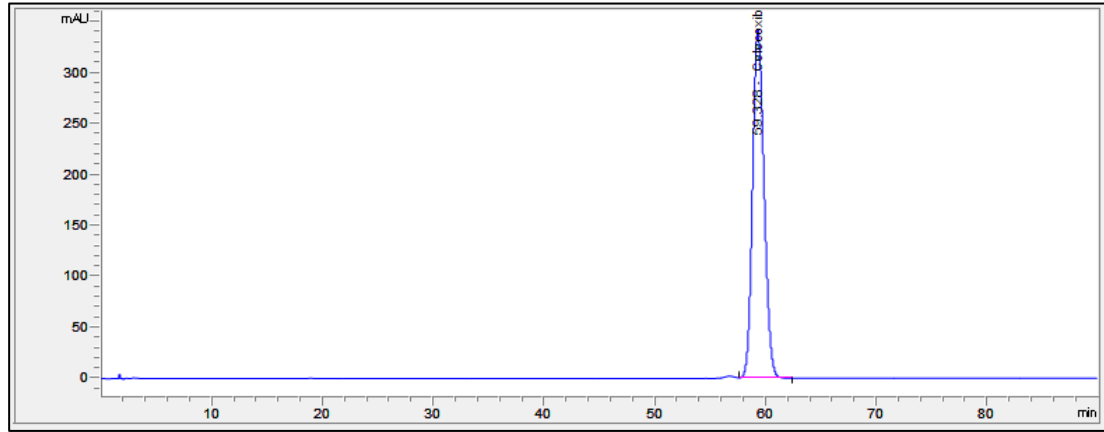
Fonksiyonel Grup Bağ Adı	Üretici Firma Sonuçları (cm <sup>-1</sup> )	Deneysel Sonuçları (cm <sup>-1</sup> )
NH titreşim gerilimleri	3341 ve 3234	3332 ve 3226
Aromatik halkadaki C-H titreşim gerilimleri	3099	3093
C=N titreşim gerilimleri	1498 ve 1474	1497 ve 1472
C=C titreşim gerilimleri	1446	1444
NH bükülme ( <i>bending</i> ) gerilimleri	1374	1374
CH <sub>3</sub> içindeki CH <sub>3</sub> bükülme gerilimleri	1347	1344
C-N titreşim gerilimleri	1275	1273
CF <sub>3</sub> titreşim gerilimleri	1230	1228
SO <sub>2</sub> titreşim gerilimleri	1164	1154
Aromatik halkadaki C-H düzlem içindeki bükülme titreşim gerilimleri	1103, 1093 ve 981	1090 ve 980
Aromatik halkadaki C-H düzlem dışındaki bükülme titreşim gerilimleri	846, 792 ve 762	844, 790 ve 760



Şekil 4.1. Selekoksib FTIR spektrumu.

#### 4.1.2. Selekoksib Etkin Madde Miktar Tayini

İşlem görmemiş selekoksib etkin maddesinin miktar tayini çalışmaları 3.5.2. bölümünde verilen numune hazırlama yöntemi ve Tablo 3.1.'de verilen kromatografik koşullar kullanılarak yapılmıştır. Farmakopelerde belirtilen valide bir yöntem olması nedeniyle yöntemin validasyonu yapılmamıştır. HPLC yöntemi ile yapılan selekoksib miktar tayinine ilişkin örnek kromatogram Şekil 4.2.'de, miktar tayini çalışmasına ilişkin sonuçlar Tablo 4.2.'de verilmiştir. Elde edilen % miktar tayini değeri etkin madde üreticisi tarafından tespit edilen sonuç ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar sırasıyla %100,1 ve %100,2 olarak bulunmuştur ve birbiri ile benzerdir.



Şekil 4.2. Selekoksibin 500 µg/mL konsantrasyondaki çözeltisine ilişkin örnek kromatogram.

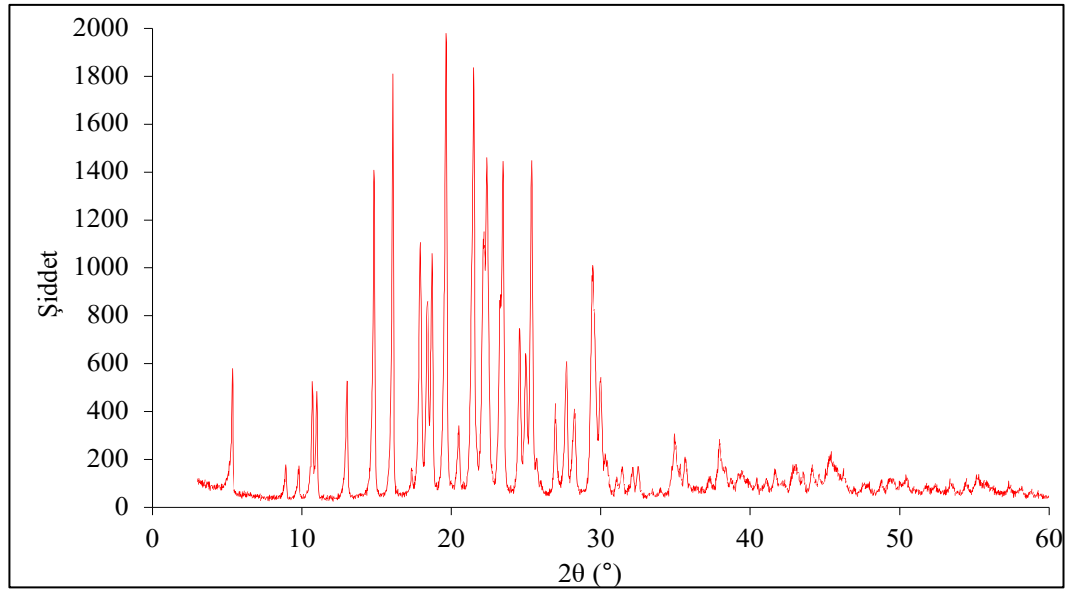
Tablo 4.2. Selekoksib etkin madde miktar tayini (%) sonuçları.

	Üretici Firma Sonucu	DeneySEL Sonuç
Selekoksisib Miktar Tayini (%)	100,1	100,2

#### 4.1.3. X-Işını Difraksiyonu (XRD)

Selekoksisibin kristal şeklinin üreticinin etkin madde ana dosyasında belirttiği gibi Form-III olduğunu tespit edilebilmek amacıyla X-ışını difraksiyonu (*X-ray diffraction*, XRD) analizleri yapılmıştır. Kristal selekoksisibin X-ışını difraktometresinde verdiği karakteristik keskin pikler 16,0; 19,6; 21,5; 22,3; 23,4; 25,3 ve  $29,4^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$   $2\theta$  değerlerinde gözlenmektedir (104-106, 110). Ancak kristal Form-III için karakteristik keskin pikler 5,3; 10,7; 11,0; 13,0; 14,8; 16,1; 17,9; 18,4; 18,7; 19,6;

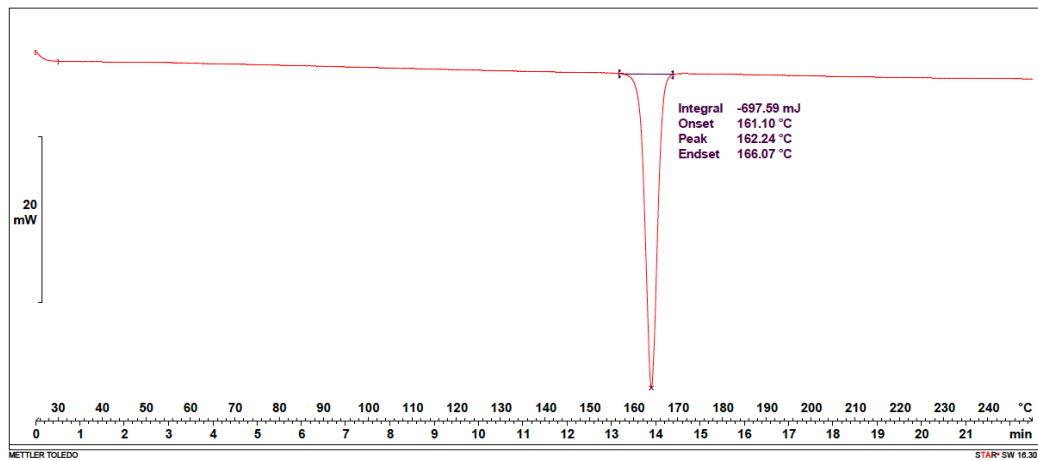
21,5; 22,1; 22,4; 23,4; 25,3 ve  $29,5 \pm 0,2^\circ$   $2\theta$  değerlerinde gözlenmektedir (93, 152, 153). Şekil 4.3.'te verilen X-ışını difraktogramında kristal Form-III'a ilişkin karakteristik pikler deneysel olarak da gözlenmiştir.



**Şekil 4.3.** İşlem görmemiş selekoksib Form-III etkin maddesine ilişkin X-ışını difraktogramı.

#### 4.1.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)

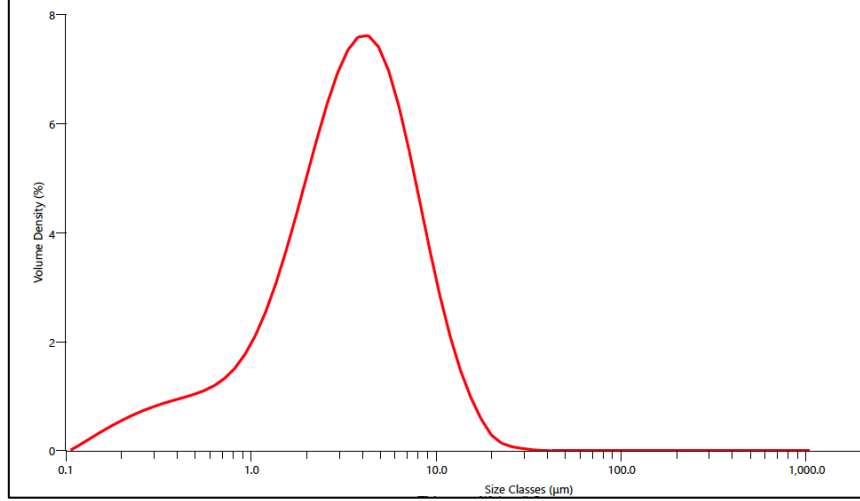
Şekil 4.4.'te verilen termogramda  $161,10^\circ\text{C}$ 'de başlayan ve  $162,24^\circ\text{C}$ 'de pik değere ulaşip  $166,04^\circ\text{C}$ 'de sonlanan selekoksib erimesine ilişkin endotermik bir pik gözlenmiştir.



**Şekil 4.4.** İşlem görmemiş selekoksib etkin maddesine ilişkin DSC termogramı.

#### 4.1.5. Partikül Büyüklüğü Dağılımı (PSD)

İşlem görmemiş selekoksib etkin maddesinin partikül büyüklüğü dağılımına ilişkin partikül büyüklüğü dağılım grafiği Şekil 4.5.'te verilmiştir. Partiküllerin hacim büyüklük dağılım değerleri; d10: 0,81  $\mu\text{m}$ , d50: 3,45  $\mu\text{m}$  ve d90: 8,73  $\mu\text{m}$  olarak saptanmıştır.



Şekil 4.5. İşlem görmemiş selekoksib etkin maddesine ilişkin PSD grafiği.

### 4.2. Selekoksib Miktar Tayini Çalışmalarında Kullanılan Analitik Yöntemin Validasyonu

Selekoksib miktar tayini için literatürden hareketle geliştirilen HPLC yöntemi ilgili ICH kılavuzunda tavsiye edildiği şekliyle valide edilmiştir (51).

#### 4.2.1. Sistem Uygunluğu

3.6.1. bölümünde verilen örnek hazırlama yöntemi ve Tablo 3.3.'te verilen kromatografik koşullar kullanılarak 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  konsantrasyondaki standart selekoksib çözeltisi ile sistem uygunluk testi yapılmıştır ( $n=6$ ). Kuyruklanma faktörü (pik simetrisi) ( $T < 2$ ), enjeksiyon tekrarlanabilirliği ( $\text{RSD} < \%1$ ), kapasite faktörü ( $k' > 2$ ), teorik plaka sayısı ( $N > 2000$ ) değerleri Tablo 4.3.'te verilmiştir. Selekoksibin alıkonma süresi ( $t_R$ ) 8 dakika ve toplam analiz süresi 12 dakikadır (Şekil 4.6.).



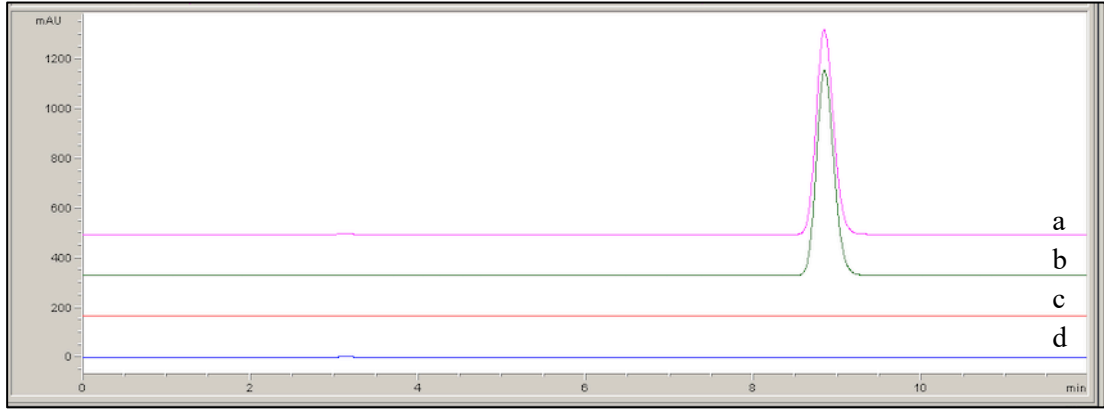
**Tablo 4.3.** Selekoksib sistem uygunluğu verileri.

Enjeksiyon	Pik Alanı	Pik simetrisi	k'	Teorik Plaka Sayısı
1	12070,4	0,843	16,73	8689
2	12053,8	0,843		
3	12065,5	0,842		
4	12059,6	0,845		
5	12055,5	0,844		
6	12060,8	0,842		
<b>Ortalama</b>	<b>12060,9</b>			
<b>RSD (%)</b>	<b>0,05</b>			

**Şekil 4.6.** Selekoksibin 200 µg/mL konsantrasyondaki standart çözeltisine ilişkin örnek kromatogram.

#### 4.2.2. Özgüllük

Geliştirilen selekoksib miktar tayini yönteminde analitik yöntemin, selekoksib ile öğütme bileşimlerinde ve/veya formülasyon bileşiminde yer alan diğer maddeler arasında girişim olmadığını göstermek, yöntemin ayırt edebilme yeteneğini tayin edebilmek için özgüllük testleri yapılmıştır. Seyreltme çözeltisi, plasebo çözeltisi, standart çözelti (200 µg/mL) ve test çözeltisine (200 µg/mL) ilişkin kromatogram üst üste çizilerek görsel olarak karşılaştırılmıştır (Şekil 4.7.). Kromatogramlarda selekoksib piki ile girişim yapan herhangi bir pik gözlenmemiştir.



**Şekil 4.7.** Özgüllük çalışmasına ilişkin örnek kromatogramlar: a) test çözeltisi, b) standart çözelti, c) seyreltme çözeltisi, d) plasebo çözeltisi.

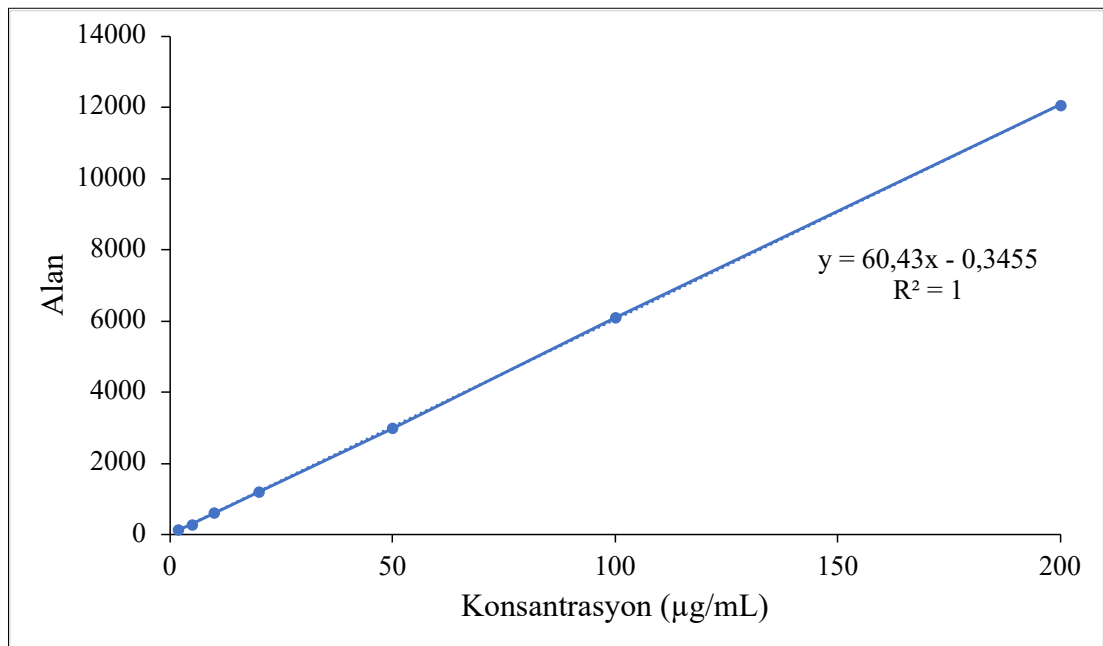
#### 4.2.3. Doğrusallık ve Aralık

Geliştirilen selekoksib miktar tayini yönteminde analitik yöntemin doğrusallığını değerlendirmek amacıyla en küçük kareler yöntemi kullanılarak basit doğrusal regresyon analizi uygulanmıştır. Çözünürlük, intrinsik çözünme hızı, çözünme ve permeabilite testlerinde gözlenebilecek konsantrasyon değerlerini tespit edebilmek amacıyla 2 µg/mL-200 µg/mL konsantrasyon aralığında yapılan doğrusallık çalışması sonucunda, bu konsantrasyon aralığındaki selekoksib için analitik yöntem doğrusal bulunmuştur. Regresyon analizi yapılarak birinci dereceden polinomial denklem oluşturulmuş, denklemin tanımlayıcılık katsayısı olan  $R^2$  değeri 0,999'dan büyük olarak bulunmuştur. Doğru denklemi Eşitlik 4.1.'de verilmiştir. Doğrusallık ve aralık çalışmasına ilişkin analiz sonuçları Tablo 4.4.'te, doğrusal regresyon analizi sonucu elde edilen regresyon doğrusu Şekil 4.8.'de verilmiştir.

$$Y = 60,43x - 0,3455 \quad (4.1.)$$

**Tablo 4.4.** 7 farklı konsantrasyonda hazırlanan çözelti alanları.

Konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ )	Pik Alanı
2	132,7
5	293,5
10	603,6
20	1203,8
50	2984,7
100	6098,1
200	12067,6

**Şekil 4.8.** Selekoksib miktar tayini yöntemine ilişkin regresyon doğrusu. y; pik alanını, x; selekoksib konsantrasyonunu göstermektedir.

#### 4.2.4. Doğruluk

Geliştirilen selekoksib miktar tayini yönteminde analitik yöntemin doğruluğu % geri kazanım değerleri ile değerlendirilmiştir. Üç farklı konsantrasyondaki doğruluk çözeltilerine ilişkin % geri kazanım sonuçları Tablo 4.5.'te verilmiştir. Elde edilen % geri kazanım sonuçları %98-102 aralığında bulunmuş ve yöntemin doğru olduğu gösterilmiştir.

**Tablo 4.5.** Doğruluk parametresi % geri kazanım sonuçları.

Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Tartılan Selekoksib Miktarı (mg)	Selekoksisb Konsantrasyonu (µg/mL)	Pik Alanı	Hesaplanan Selekoksib Miktarı (mg)	Geri Kazanım (%)	Ortalama Geri Kazanım (%)
100	5,10	102,00	6100,7	5,06	99,18	99,46
	5,06	101,20	6107,7	5,06	100,08	
	5,11	102,20	6108,3	5,06	99,11	
200	10,10	202,00	11976,2	9,93	98,31	98,72
	10,01	200,20	11972,9	9,93	99,17	
	10,08	201,60	11996,8	9,95	98,68	
240	12,51	250,20	14897,1	12,35	98,73	98,78
	12,48	249,60	14888,1	12,34	98,91	
	12,50	250,00	14881,7	12,34	98,71	

#### 4.2.5. Kesinlik

Geliştirilen selekoksisb miktar tayini yönteminde analitik yöntemin kesinlik parametresi, gün içinde (tekrarlanabilirlik) ve günler arası (ara kesinlik) çalışmalar ile değerlendirilmiştir. Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik çalışmalarından elde edilen bağlı standart sapma (%RSD) sonuçları incelenmiş, %RSD değerleri %2'nin altında bulunmuştur (Tablo 4.6., Tablo 4.7., Tablo 4.8.). Elde edilen bulgularla yöntemin kesin olduğu gösterilmiştir.

**Tablo 4.6.** Birinci gün elde edilen selekoksisb miktar tayini kesinlik sonuçları (tekrarlanabilirlik).

Test Çözeltisi	Tartım Miktarı (mg)	Konsantrasyon (µg/mL)	Pik Alanı	Miktar Tayini (%)	Ortalama Miktar Tayini (%)	RSD (%)
1	10,44	208,80	12544,6	99,63	99,80	0,70
2	10,35	207,00	12586,5	100,83		
3	10,47	209,40	12553	99,41		
4	10,40	208,00	12539,9	99,97		
5	10,41	208,20	12555,2	100,00		
6	10,52	210,40	12526,3	98,72		

**Tablo 4.7.** İkinci gün elde edilen selekoksib miktar tayini kesinlik sonuçları (ara kesinlik).

Test Çözültisi	Tartım Miktarı (mg)	Konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ )	Pik Alanı	Miktar Tayini (%)	Ortalama Miktar Tayini (%)	RSD (%)
1	10,41	208,20	12540,6	99,88	99,60	0,96
2	10,36	207,20	12586,2	100,73		
3	10,45	209,00	12550	99,57		
4	10,50	210,00	12540,9	99,03		
5	10,36	207,20	12545,2	100,40		
6	10,57	211,40	12506,3	98,10		

**Tablo 4.8.** İki gün boyunca elde edilen kesinlik sonuçları.

	Birinci Güne İlişkin Ortalama Sonuçlar (%)	İkinci Güne İlişkin Ortalama Sonuçlar (%)	Günler Arası Ortalama Sonuçlar (%)	Günler Arası RSD (%)
Miktar Tayini (%)	99,80	99,60	99,70	0,10

#### 4.2.6. Duyarlılık

Geliştirilen selekoksib miktar tayini yönteminde analitik yöntemin teşhis sınırı (*Limit of Detection*, LOD) ve tayin sınırı (*Limit of Quantitation*, LOQ) değerleri sinyal/gürültü (S/G) oranları ile değerlendirilmiştir. Selekoksib için teşhis sınırı 0,4  $\mu\text{g/mL}$  ((S/G = 3:1) ve tayin sınırı 1,4  $\mu\text{g/mL}$  ((S/G = 10:1) olarak bulunmuştur.

#### 4.2.7. Stabilite

Hazırlanan selekoksib çözeltilerinin çözelti stabilitesini değerlendirmek için 200  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonunda örnekler hazırlandıktan sonra bekletilmeden, 24. ve 48. saatlerde yapılan analiz sonuçları incelenmiştir. 24 ve 48. saatteki pik alan değerleri başlangıçtaki pik alan değerleri ile karşılaştırılmıştır. Alanlar arasındaki % uyum sonuçları %98-102 aralığında bulunmuş ve selekoksib çözeltilerinin 48 saat boyunca stabil olduğu gösterilmiştir (Tablo 4.9.)

**Tablo 4.9.** Selekoksib çözeltilerinin stabilitesine ilişkin analiz sonuçları.

Zaman (saat)	Standart Çözelti		Test Çözeltisi	
	Pik Alanı	Uyum (%)	Pik Alanı	Uyum (%)
0	12070,4	-	11876,2	-
24	12068,1	99,98	11877,9	100,01
48	12069,3	99,99	11875,7	99,99

#### 4.2.8. Filtre Çalışması

Selekoksib miktar tayini analizlerinde hazırlanan örneklerin 0,45 µm hidrofilik PTFE filtre materyali ile geçimli olduğu ve filtre materyaline adsorbe olmadığını tespit edebilmek için yapılan filtre çalışmasına ilişkin sonuçlar Tablo 4.10.'da verilmiştir. Standart ve test çözeltilerinin süzülmeden yapılan analiz sonuçları ve 0,45 µm hidrofilik PTFE filtreden süzülükten sonra yapılan analiz sonuçlarına ilişkin pik alanları karşılaştırılmıştır. Alanlar arasındaki % uyum sonuçları %98-102 aralığında bulunmuş ve 0,45 µm hidrofilik PTFE filtrenin uygun olduğu gösterilmiştir.

**Tablo 4.10.** Selekoksib çözeltilerinin filtre çalışmasına ilişkin analiz sonuçları.

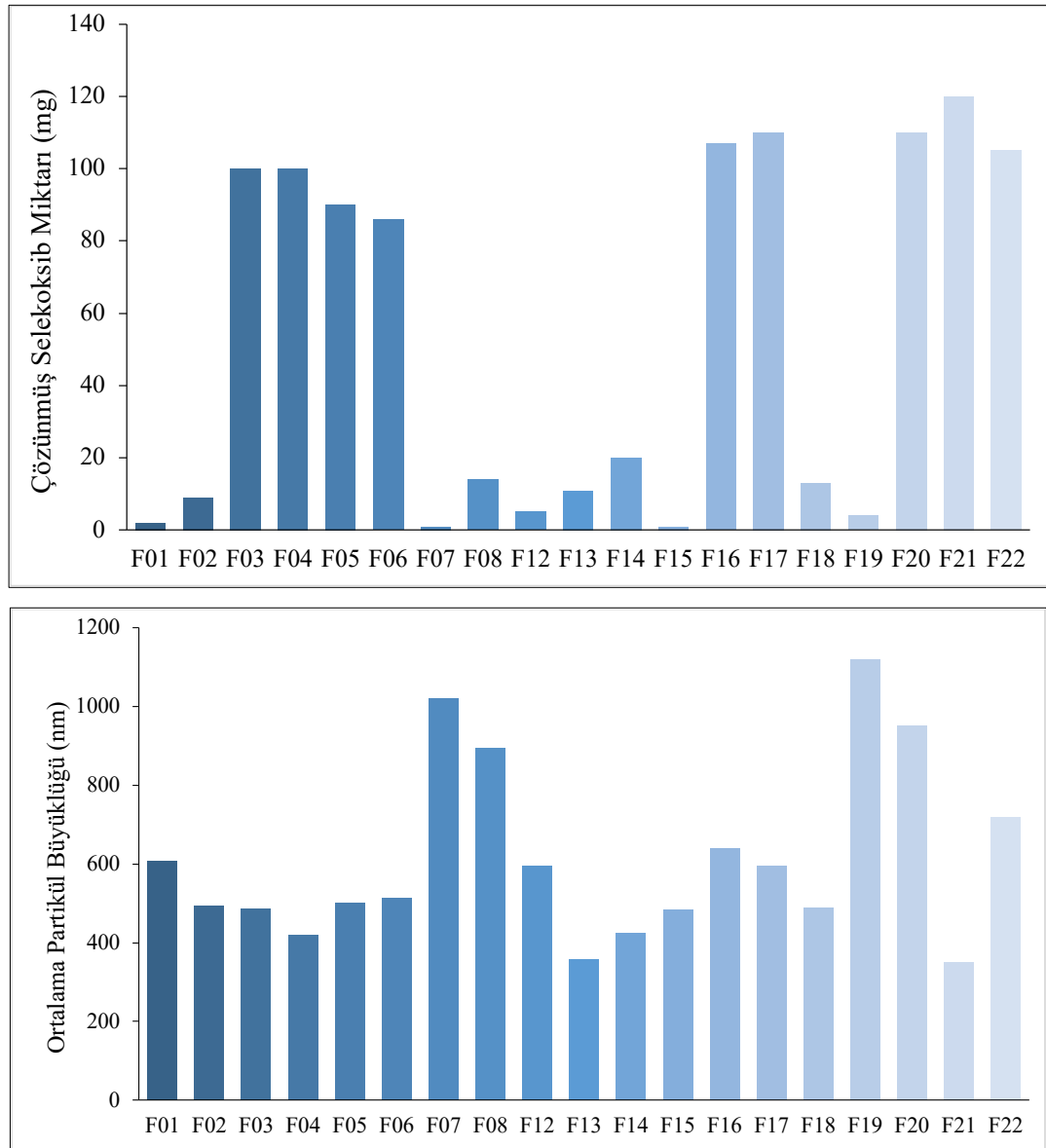
Enjeksiyon	Standart Çözelti		Test Çözeltisi	
	Süzülmeyen	0,45 µm Hidrofilik PTFE Filtreden Süzülen	Süzülmeyen	0,45 µm Hidrofilik PTFE Filtreden Süzülen
1	12096,0	12070,4	12575,0	12544,6
2	12079,1	12053,8	12585,0	12586,5
3	12087,0	12065,5	12533,2	12553,0
4	12019,9	12059,6	12561,4	12539,9
5	12067,6	12055,5	12546,0	12555,2
6	12072,0	12060,8	12597,2	12526,3
Ortalama	12070,3	12060,9	12566,3	12550,9
RSD (%)	0,22	0,05	0,19	0,16
Uyum (%)	99,92		99,88	

### 4.3. Mikronaltı/Nano-boyutta Selekoksis Bileşimlerinin Hazırlanması: Ön Tarama Deneyleri

Mikronaltı/nano-boyutta selekoksis bileşimlerinin elde edilebilmesi ve selekoksinin çözünürlüğünün arttırılabilmesi için tek başına ve birlikte kuru öğütme yöntemi uygulanmış, farklı kimyasal özelliklere sahip yardımcı maddeler ile ön tarama deneyleri yapılmıştır. Tek başına ve birlikte kuru öğütme deneyleri sonucunda üretilen selekoksis bileşimlerinin ortalama partikül büyüklüğü ölçülmüştür. Ek olarak selekoksinin en yüksek çözünürlüğe sahip olduğu çözünme ortamı olan pH 12 ortamında intrinsik çözünme hızı tespit edilmiş, pH 12 ortamında yapılan intrinsik çözünme hızı testinde 60. dakikanın sonunda çözünmüş selekoksis miktarları karşılaştırılarak, yardımcı maddelerin çözünürlük üzerine etkisi değerlendirilmiştir. İntrinsik çözünme hızı testleri, Tablo 3.12.'de belirtilen deney koşulları kullanılarak yapılmıştır. Bu deney koşullarından farklı olarak çözünme ortam hacmi 1000 mL ve selekoksis miktarı 150 mg olacak şekilde çalışılmıştır. İntrinsik çözünme hızı ve ortalama partikül büyüklüğü testlerine ilişkin sonuçlar Tablo 4.11.'de formülasyonların karşılaştırmalı çubuk grafikleri Şekil 4.9.'da verilmiştir.

Selekoksis tek başına kuru yöntem ile öğütüldüğünde ortalama partikül büyüklüğü 5 µm'den 600 nm'ye düşürülmüştür. Ancak pH 12 çözünme ortamında, 60. dakikanın sonunda çözünmüş selekoksis miktarı 2 mg/1000 mL olarak bulunmuştur. Birlikte kuru öğütme yöntemi ile hazırlanan formülasyonların tamamında selekoksis ortalama partikül büyüklüğü işlem görmemiş selekoksibe göre oldukça düşüktür. F09, F10 ve F11 kodlu formülasyonlarda birlikte kuru öğütme sonucunda öğütme bileşiminde renk değişimi meydana geldiği için bu formülasyonlar değerlendirmeye alınmamıştır, renk değişimine öğütme işleminde kimyasal bir etkileşimin neden olduğu düşünülmektedir. Formülasyonlara ilişkin pH 12 ortamında çözünmüş selekoksis miktarları değerlendirildiği zaman; öğütme bileşiminde PVP ve türevlerinin (PVP-VA gibi) bulunması ile çözünmüş miktarın arttığı gözlenmiştir. F01, F03, F20 ve F21 formülasyonlarının XRD analizleri yapılarak bu formülasyonlardaki selekoksinin polimorfik yapısı incelenmiştir (Şekil 4.10.) F03 formülasyonunun XRD difraktogramında selekoksinin kristal şekline spesifik olan pikler kaybolmuştur. F01, F20 ve F21 formülasyonlarında ise kristal şekline ilişkin piklerin korunduğu gözlenmiştir. F03 formülasyonu için XRD analizine ek olarak

FTIR analizi yapılmıştır (Şekil 4.11.). FTIR spektrumunda, 3332 ve 3226  $\text{cm}^{-1}$ 'deki NH bağına ilişkin piklerin kaybolduğu görülmüştür.

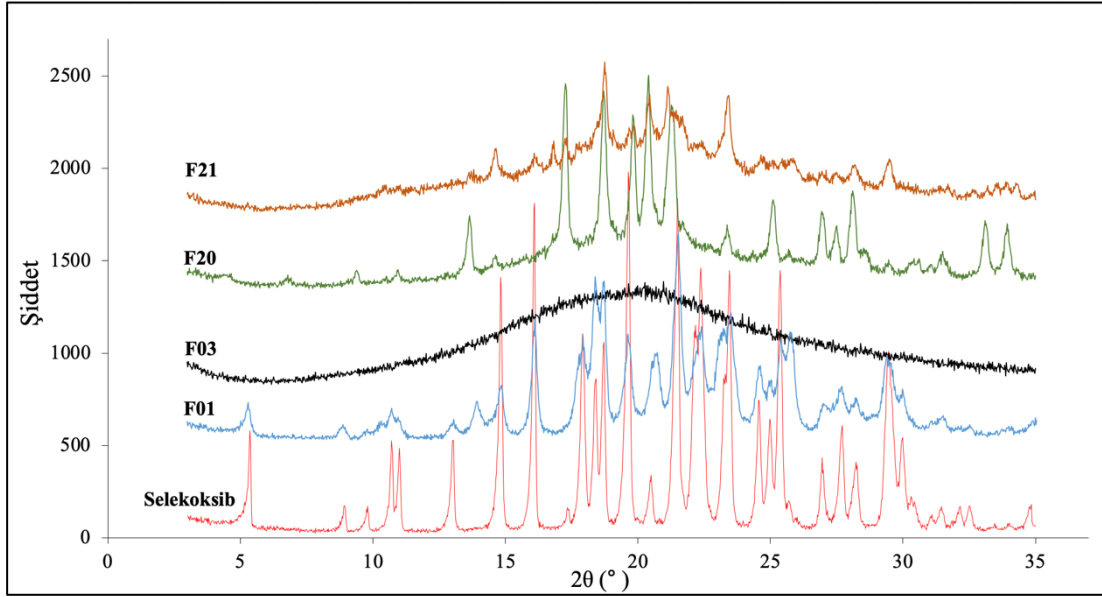


**Şekil 4.9.** Ön tarama deneylerinde hazırlanan formülasyonlara ilişkin çözünmüş selekoksib miktarı (pH 12'de 60. dakikada) (mg) ve ortalama partikül büyüklüğü (nm) çubuk grafikleri.

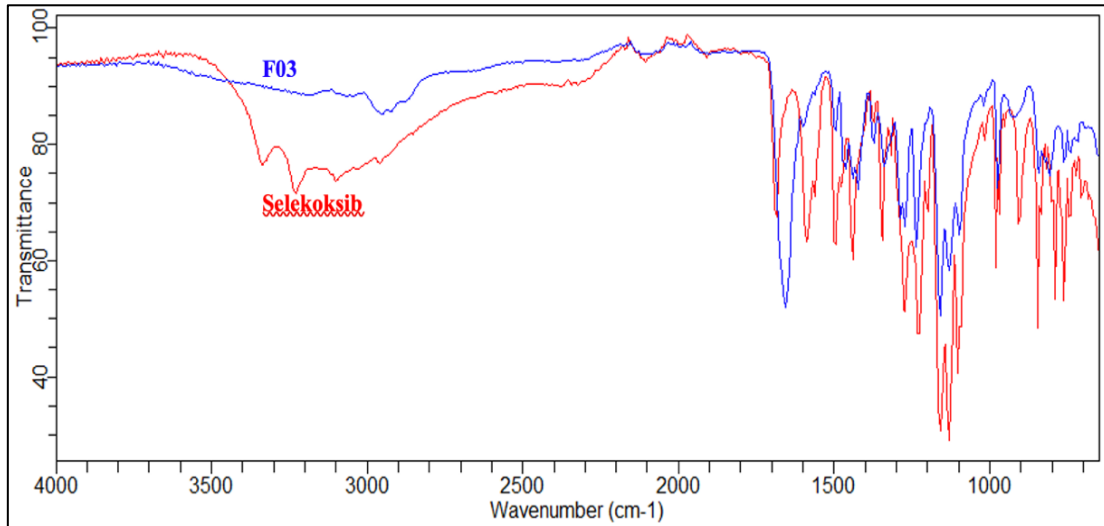


**Tablo 4.11.** Ön tarama deneylerinde hazırlanan formülasyonlara ilişkin çözünmüş selekoksib miktarı (pH 12’de 60. dakikada) ve ortalama partikül büyüklüğü sonuçları.

Formülasyon Kodu	Öğütme Bileşimi	Selekoksib: Yardımcı Madde Ağırlık Oranı	pH 12’de 60. dakikada Çözünmüş Selekoksib Miktarı	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)
F01	CXB	1	2	606
F02	CXB:SLS	1:0,2	9	494
F03	CXB:PVP K12	1:1	100	486
F04	CXB:PVP K12:SLS	1:1:0,2	100	420
F05	CXB:PVP K30	1:1	90	502
F06	CXB:PVP K90	1:1	86	512
F07	CXB:LHPC LH 21	1:2	1	1020
F08	CXB:HEC	1:2	14	894
F09	CXB:HEC:SLS	1:2:0,2	-	-
F10	CXB:HEC:PS40	1:2:0,2	-	-
F11	CXB:HEC:SLS:PS40	1:2:0,2:0,2	-	-
F12	CXB:LAC	1:2	5	596
F13	CXB:LAC:SLS	1:2:0,2	11	357
F14	CXB:LAC:SLS:PS40	1:8,6:0,2:0,2	20	425
F15	CXB:MAS	1:5	1	485
F16	CXB:PVP-VA	2:1	107	640
F17	CXB:PVP-VA:SLS	2:1	110	595
F18	CXB:SOL	1:1	13	487
F19	CXB:MAN	1:1	4	1120
F20	CXB:PVP:MAN	1:1	110	950
F21	CXB:PVP:MAN:SLS	1:1,5:0,5:0,2	120	350
F22	CXB:PVP:MAN:SLS	1:0,5:1,5:0,2	105	720



**Şekil 4.10.** Selekoksib, F01, F03, F20 ve F21'e ilişkin XRD difraktogramları.



**Şekil 4.11.** Selekoksib ve F03'e ilişkin FTIR spektrumları.

Ön tarama deneylerinde pH 12 çözünme ortamında en yüksek çözünmüş selekoksib miktarına sahip formülasyonların (F03, F14, F20, F21, F22) ve selekoksibin pH 1,2+±0,2 SLS çözünme ortamında yapılan intrinsik çözünme hızı testinde 120. dakika çözünmüş selekoksib miktarları tayin edilmiştir (Tablo 4.12.).

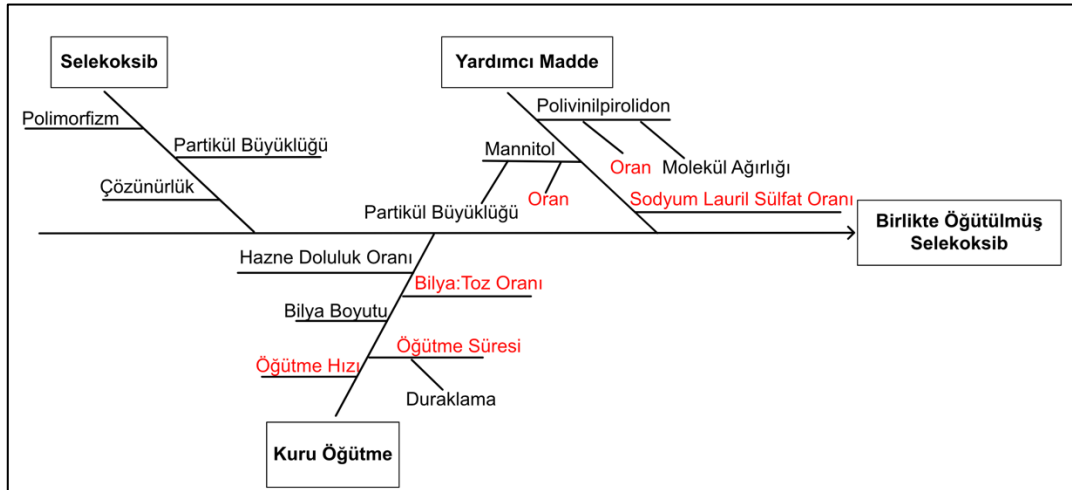
**Tablo 4.12.** Ön tarama deneylerinde hazırlanan formülasyonlara ve selekoksibe ilişkin çözünmüş selekoksib miktarı (pH 1,2+±0,2 SLS’de 120. dakikada).

<b>Formülasyon Kodu</b>	<b>pH 1,2+±0,2 SLS, 120. Dakikada Çözünmüş Selekoksisib Miktarı (mg/500 mL)</b>
Selekoksisib	0.5
F03	2
F14	12.5
F20	15
F21	50
F22	30

Öğütme bileşimine mannitol ve sodyum lauril sülfatın da eklenmesi sonucunda en yüksek çözünmüş selekoksisib miktarları ve tamamen amorf forma dönüşmemiş selekoksisib partikülleri elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda selekoksisib, PVP, mannitol ve SLS içeren öğütme bileşimlerinin ileri deney tasarımı ile ayrıntılı olarak araştırılmasına karar verilmiştir.

#### **4.4. Risk Faktörlerinin Belirlenmesi: Ishikawa Diyagramı**

PVP, mannitol ve SLS yardımcı maddeleri, ön tarama deneylerinde elde edilen bulgulara göre en uygun birlikte öğütme ekspanları olarak seçilmiştir. Kritik formülasyon ve üretim işlem parametrelerinin, birlikte öğütülmüş selekoksisib bileşiminin kritik kalite özellikleri olarak belirlenen partikül büyüklüğü, pH 12’de çözünmüş selekoksisib miktarı, pH 1,2+±0,2 SLS’de çözünmüş selekoksisib miktarı ve sudaki çözünürlük üzerine potansiyel risklerini belirleyebilmek amacıyla balık kılıcı (Ishikawa) diyagramı oluşturulmuştur. Ön bilgiler ve ön tarama deneyleri temelinde altı potansiyel risk etkeni belirlenmiştir ve kırmızı renk ile gösterilen bu etkenler ileri deneysel tasarımlarda değerlendirmeye alınmıştır (Şekil 4.12).



**Şekil 4.12.** Birlikte öğütülmüş selekoksib bileşiminin kritik kalite özelliklerini etkileyebilecek formülasyon ve üretim işlem parametrelerini gösteren balık kılçığı (Ishikawa) diyagramı.

#### 4.5. Plackett-Burman Deney Tasarımı

Mikronaltı/nano-boyutta selekoksib bileşimlerinin arzu edilen özelliklerini etkileyeceği öngörülen 6 bağımsız değişkenin 4 yanıt değişkeni üzerindeki etkisini belirleyebilmek için 12 deneyli, 0 merkez noktalı bir Plackett-Burman deney tasarımı kullanılmıştır. Hazırlanan 12 formülasyonun her biri için yanıt değişkenler olarak; ortalama partikül büyüklüğü ( $Y_1$ ), pH 12’de 30. dakikada çözülmüş selekoksib miktarı ( $Y_2$ ), pH 1,2+ $\pm$ 0,2 SLS’de 120. dakikada çözülmüş selekoksib miktarı ( $Y_3$ ) ve sudaki çözünürlük ( $Y_4$ ) kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir. Test edilen formülasyonlar ve yanıt değişkenlere ilişkin veriler Tablo 4.13.’te verilmiştir.

**Tablo 4.13.** Plackett-Burman deney tasarımı ile elde edilen yanıt değişken değerleri\*.

Formülasyon Kodu	Y <sub>1</sub> : Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	Y <sub>2</sub> : pH 12'de 30. dakikada çözünmüş selekoksib miktarı (mg/500 mL)	Y <sub>3</sub> : pH 1,2+%0,2 SLS'de 120.dakikada çözünmüş selekoksib miktarı (mg/500 mL)	Y <sub>4</sub> : Sudaki çözünürlük (µg/mL)
PB01	580	4,1	0,8	2,4
PB02	650	28,1	1,3	2,6
PB03	721	67,5	5	3,1
PB04	1100	29,2	0,7	1,7
PB05	350	73	43,1	8,6
PB06	720	64,2	12	3,7
PB07	606	80,12	18,9	4,3
PB08	823	36,42	42	6,9
PB09	645	18,11	1,2	2,5
PB10	587	17,3	5,9	3,1
PB11	677	23,21	5	3
PB12	1012	16,27	8	3,5

\*Minitab® 19 yazılımında doğrudan ortalama değerlerin kullanılması ve bu değerler ile istatistiksel hesaplama yapılması nedeniyle tabloda sadece ortalama değerler sunulmuştur.

Plackett-Burman deney tasarımı sonucunda elde edilen yanıt değişkenlere ilişkin veriler kullanılarak varyans analizi yapılmış ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.14.).

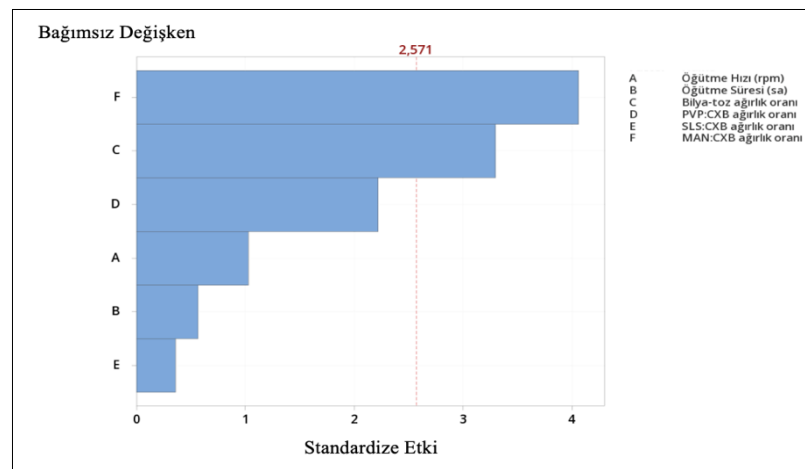
**Tablo 4.14.** Plackett-Burman deney tasarımı ile elde edilen bağımlı değişken değerlerinin istatistiksel analizi.

	<b>Y<sub>1</sub>: Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)</b>		<b>Y<sub>2</sub>: pH 12'de 30. Dakika Çözünmüş Selekoksib Miktarı (mg/500 mL)</b>		<b>Y<sub>3</sub>: pH 1,2+%0,2 SLS'de 120. Dakika Çözünmüş Selekoksib Miktarı (mg/500 mL)</b>		<b>Y<sub>4</sub>: Sudaki Çözünürlük (µg/mL)</b>	
	<b>Katsayı</b>	<b><i>p</i> Değeri</b>	<b>Katsayı</b>	<b><i>p</i> Değeri</b>	<b>Katsayı</b>	<b><i>p</i> Değeri</b>	<b>Katsayı</b>	<b><i>p</i> Değeri</b>
Sabit	705,9	0,039	38,13	0,042	11,99	0,046	3,783	0,041
X <sub>1</sub> : Öğütme hızı (devir/dk)	31,6	0,350	-1,90	0,660	-6,58	0,043	-0,717	0,070
X <sub>2</sub> : Öğütme süresi (saat)	17,4	0,594	2,23	0,607	-4,69	0,112	-0,717	0,070
X <sub>3</sub> : Bilya:toz ağırlık oranı	-101,1	0,022	15,24	0,013	2,36	0,377	0,433	0,223
X <sub>4</sub> : PVP:CXB ağırlık oranı	-68,1	0,077	13,26	0,022	7,23	0,031	0,967	0,027
X <sub>5</sub> : SLS:CXB ağırlık oranı	-11,1	0,732	0,27	0,949	7,34	0,030	1,017	0,022
X <sub>6</sub> : MAN:CXB ağırlık oranı	124,4	0,010	10,82	0,045	2,44	0,362	0,083	0,800

Varyans analizi sonucunda pareto grafikleri çizilmiştir. Pareto grafiği, en büyük etkiden en küçük etkiye kadar standartlaştırılmış etkilerin mutlak değerini gösterir. Ayrıca, grafik hangi bağımsız değişkenlerin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu belirtmek için bir referans çizgisi çizer. Grafikte kırmızı kesikli çizgi olarak gösterilen bu referans çizgisi, anlamlılık düzeyi olan  $p$  değerine bağlıdır. Grafikte referans çizgisini geçen çubuk grafiklere ilişkin bağımsız değişkenler istatistiksel olarak anlamlıdır (154).

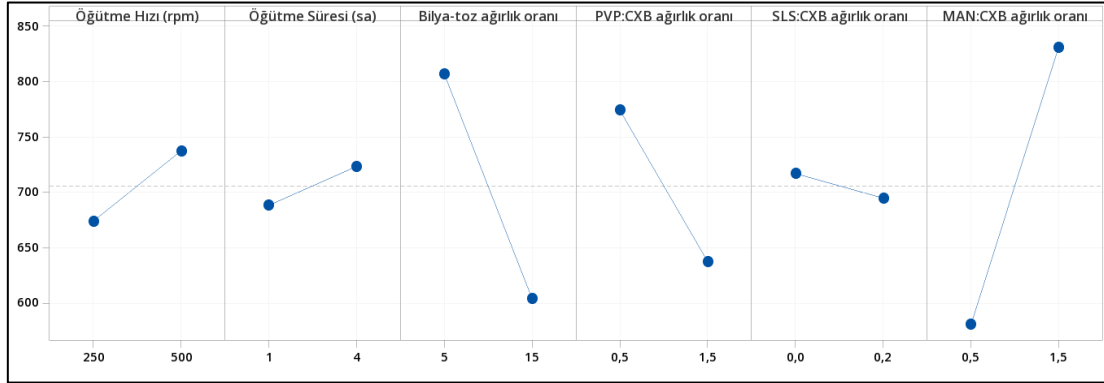
Pareto grafiği, etkilerin mutlak değerini gösterdiğinden, hangi etkilerin yanıt arttırdığını veya azalttığını belirlemek mümkün değildir. Bu nedenle etkilerin büyüklüğünü ve yönünü incelemek için varyans analizi (ANOVA) sonucu elde edilen katsayı değerleri dikkate alınır (Tablo 4.14.). Ek olarak bağımsız değişkenlerin yanıt değişkeni üzerine etkilerini açıklayan doğrusal modele ilişkin regresyon denklemi etkilerin yönü hakkında bilgi verir. Eşitlikte pozitif değere sahip bağımsız değişkenler, yanıt değişkeninde artışa neden olurken; negatif değere sahip bağımsız değişkenler yanıt değişkeninde azalmaya neden olmaktadır.

Ortalama partikül büyüklüğü ( $Y_1$ ) yanıt değişkeni için varyans analizi sonucunda oluşturulan pareto grafiği incelendiğinde kritik bağımsız değişkenlerin sırasıyla MAN:CXB ağırlık oranı ( $X_6$ ) ve bilya:toz ağırlık oranı ( $X_3$ ) olduğu görülmüştür (Şekil 4.13.). ANOVA sonucuna göre;  $X_6$ ,  $X_3$  bağımsız değişkenlerin ve istatistiksel modelin  $p$  değeri sırasıyla 0,010; 0,022 ve 0,039 olup istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir (Tablo 4.14.).



**Şekil 4.13.** Ortalama partikül büyüklüğü ( $Y_1$ ) yanıt değişkeni için anlamlı bağımsız değişkenleri gösteren Pareto grafiği.

Ortalama partikül büyüklüğü ( $Y_1$ ) yanıt değişkeni için oluşturulan ana etkiler grafiği bağımsız değişkenlerin etkisinin yönü hakkında bilgi vermektedir (Şekil 4.14.). Öğütme hızı, öğütme süresi ve MAN:CXB ağırlık oranındaki artışın partikül büyüklüğünün artmasına neden olduğu; bilya:toz ağırlık oranı, PVP:CXB ağırlık oranı ve SLS:CXB ağırlık oranındaki artışın partikül büyüklüğünü azalttığı gözlemlenmiştir.



**Şekil 4.14.** Ortalama partikül büyüklüğü ( $Y_1$ ) yanıt değişkeni için ana etki grafikleri.

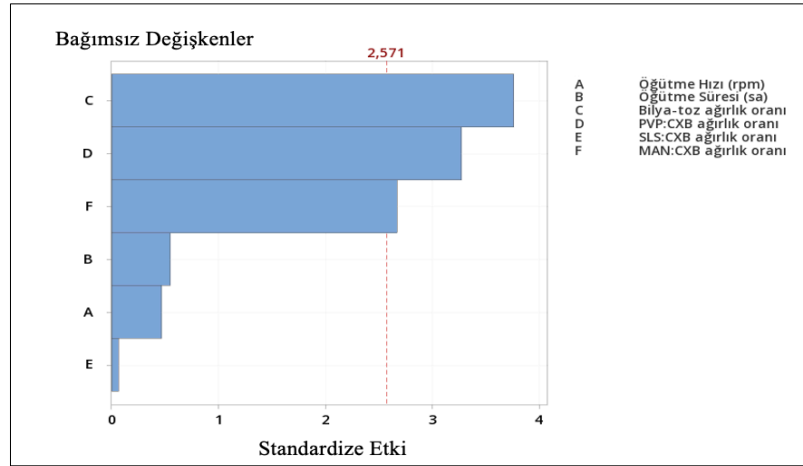
Bağımsız değişkenlerin  $Y_1$  yanıt değişkeni üzerine etkilerini açıklayan doğrusal modele ilişkin çoklu regresyon denklemi aşağıda gibidir (Eşitlik 4.1.):

$$Y_1 = 683 + 0,253X_1 + 11,6X_2 - 20,22X_3 - 136,2X_4 - 111X_5 + 248,8X_6 \quad (4.1)$$

Regresyon denkleminin ilişkin  $R^2$  değeri, deney modeli tarafından açıklanan yanıtta varyasyonun yüzdesini ifade etmektedir. Modelin verilere ne kadar uyduğunu belirlemek için kullanılmaktadır.  $Y_1$  yanıt değişkeni için kurulan modele ilişkin  $R^2$  değeri %87,11 olarak bulunmuş, bu değer test edilen modelin veriler ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

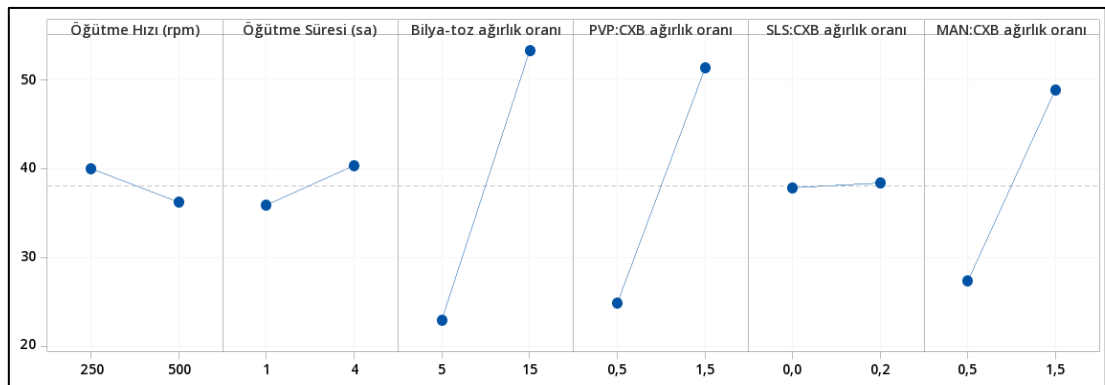
pH 12'de 30. dakikada çözülmüş selekoksib miktarı (mg) ( $Y_2$ ) yanıt değişkeni için varyans analizi sonucunda oluşturulan pareto grafiği incelendiğinde kritik bağımsız değişkenlerin sırasıyla bilya:toz ağırlık oranı ( $X_3$ ), PVP:CXB ağırlık oranı ( $X_4$ ) ve MAN:CXB ağırlık oranı ( $X_6$ ) olduğu görülmüştür (Şekil 4.15.). ANOVA sonucuna göre;  $X_3$ ,  $X_4$ ,  $X_6$  bağımsız değişkenlerinin ve istatistiksel modelin  $p$  değeri sırasıyla 0,013; 0,022; 0,045 ve 0,042 olup istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir (Tablo 4.14.).





**Şekil 4.15.** pH 12’de 30. dakikada çözülmüş selekoksib miktarı (mg) ( $Y_2$ ) yanıt değişkeni için anlamlı bağımsız değişkenleri gösteren Pareto grafiği.

pH 12’de 30. dakikada çözülmüş selekoksib miktarı (mg) ( $Y_2$ ) yanıt değişkeni için oluşturulan ana etkiler grafiği, bağımsız değişkenlerin etkisinin yönü hakkında bilgi vermektedir (Şekil 4.16.). Öğütme süresi, bilya:toz ağırlık oranı, PVP:CXB ağırlık ve MAN:CXB ağırlık oranındaki artış 30. dakikada pH 12’de çözülmüş selekoksib miktarının artmasını sağlarken; öğütme hızının artması çözünen miktarın azalmasına neden olmaktadır. SLS:CXB ağırlık oranındaki değişikliğin çözünen miktar üzerinde anlamlı bir etkisi bulunmamaktadır. Bağımsız değişkenlerin çözünen madde miktarının artışıdaki etki büyüklüğü sıralaması; bilya-toz ağırlık oranı > PVP:CXB ağırlık oranı > MAN:CXB ağırlık oranı > öğütme süresi > SLS:CXB oranı şeklindedir.



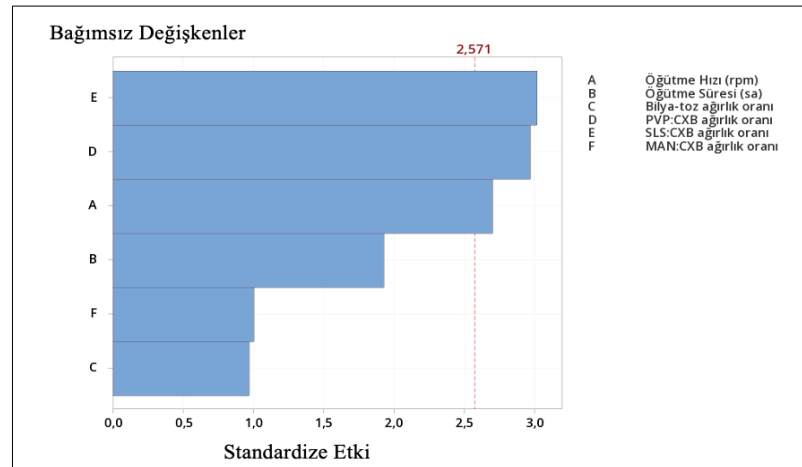
**Şekil 4.16.** pH 12’de 30. dakikada çözülmüş selekoksib miktarı (mg) yanıt değişkeni için ana etki grafikleri.

Bağımsız değişkenlerin  $Y_2$  yanıt değişkeni üzerine etkilerini açıklayan doğrusal modele ilişkin çoklu regresyon denklemi aşağıda gibidir (Eşitlik 4.2.):

$$Y_2 = -38,8 - 0,0152X_1 + 1,49X_2 + 3,049X_3 + 26,53X_4 - 2,7X_5 + 21,65X_6 \quad (4.2)$$

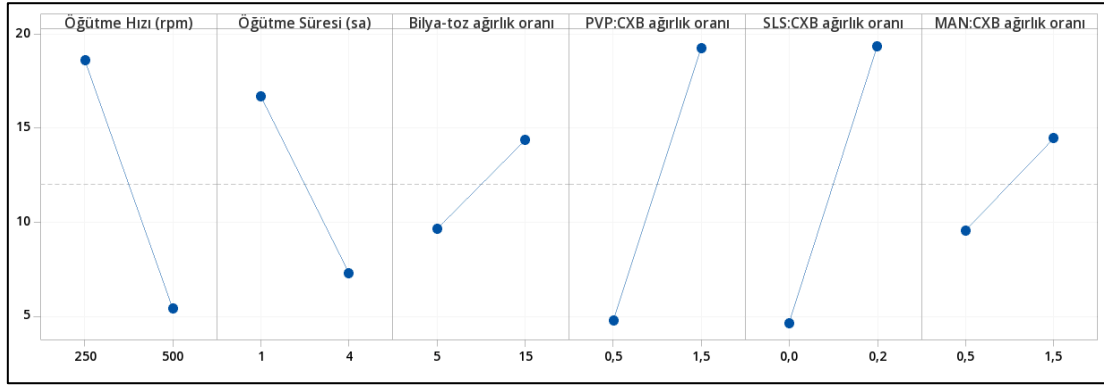
$Y_2$  yanıt değişkeni için kurulan modele ilişkin  $R^2$  değeri %86,64 olarak bulunmuştur, bu değer test edilen modelin veriler ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

pH 1,2+±0,2 SLS'de 120. dakikada çözülmüş selekoksib miktarı (mg) ( $Y_3$ ) yanıt değişkeni için varyans analizi sonucunda oluşturulan pareto grafiği incelendiğinde kritik bağımsız değişkenlerin sırasıyla; SLS:CXB ağırlık oranı ( $X_5$ ), PVP:CXB ağırlık oranı ( $X_4$ ) ve öğütme hızı ( $X_1$ ) olduğu görülmüştür (Şekil 4.17.). ANOVA sonucuna göre;  $X_5$ ,  $X_4$ ,  $X_1$  bağımsız değişkenlerinin ve istatistiksel modelin  $p$  değeri sırasıyla 0,030; 0,031; 0,043 ve 0,046 olup istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir (Tablo 4.14.).



**Şekil 4.17.** pH 1,2+±0,2 SLS'de 120. dakikada çözülmüş selekoksib miktarı (mg) ( $Y_3$ ) yanıt değişkeni için anlamlı bağımsız değişkenleri gösteren Pareto grafiği.

pH 1,2+±0,2 SLS'de 120. dakikada çözülmüş selekoksib miktarı (mg) ( $Y_3$ ) yanıt değişkeni için oluşturulan ana etkiler grafiği bağımsız değişkenlerin etkisinin yönü hakkında bilgi vermektedir (Şekil 4.18.). Bilya:toz ağırlık oranı, PVP:CXB ağırlık oranı, SLS:CXB ağırlık oranı ve MAN:CXB ağırlık oranındaki artış pH 1,2'de 120. dakikada çözülmüş selekoksib miktarının artmasını sağlarken; öğütme hızının ve öğütme süresinin artması çözünen miktarın azalmasına neden olmaktadır.



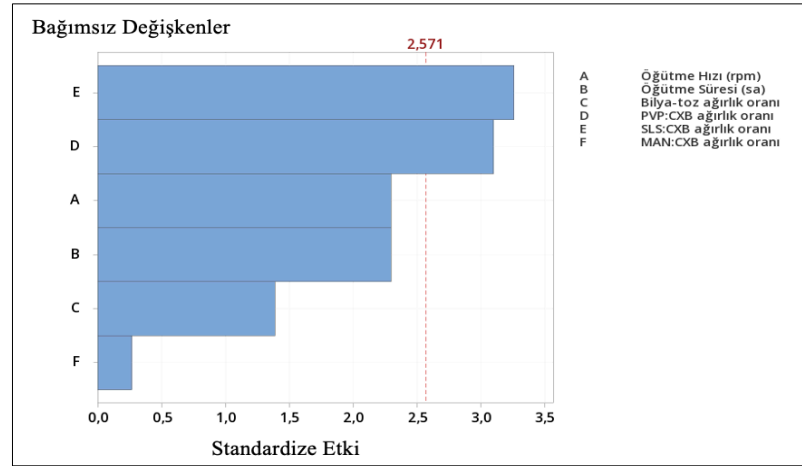
**Şekil 4.18.** pH 1,2+%0,2 SLS’de 120. dakikada çözünmüş selekoksib miktarı (mg) yanıt değişkeni için ana etki grafikleri.

Bağımsız değişkenlerin  $Y_3$  yanıt değişkeni üzerine etkilerini açıklayan doğrusal modele ilişkin çoklu regresyon denklemi aşağıda gibidir (Eşitlik 4.3.):

$$Y_3 = 8,1 - 0,0526X_1 - 3,13X_2 + 0,472X_3 + 14,45X_4 - 73,4X_5 + 4,88X_6 \quad (4.3)$$

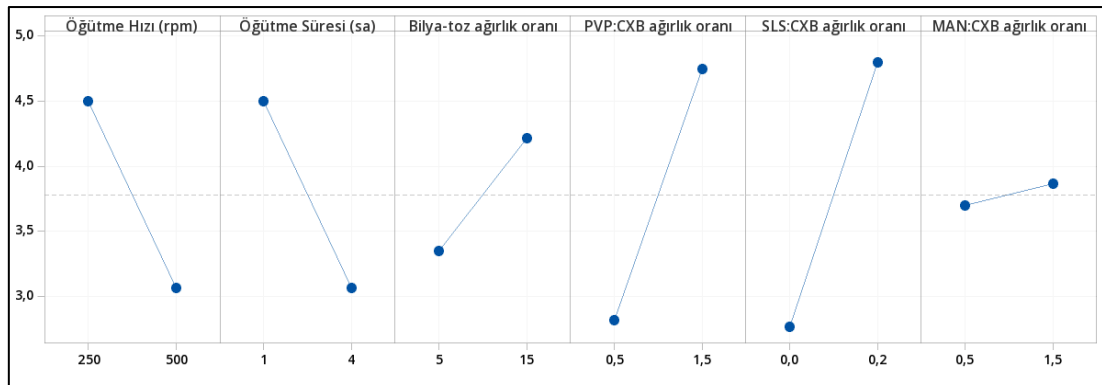
$Y_3$  yanıt değişkeni için kurulan modele ilişkin  $R^2$  değeri %86,05 olarak bulunmuştur, bu da test edilen modelin veriler ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

Sudaki çözünürlük ( $\mu\text{g/mL}$ ) ( $Y_4$ ) yanıt değişkeni için varyans analizi sonucunda oluşturulan pareto grafiği incelendiğinde en kritik bağımsız değişkenlerin sırasıyla; SLS:CXB ağırlık oranı ( $X_5$ ) ve PVP:CXB ağırlık oranı ( $X_4$ ) olduğu görülmüştür (Şekil 4.19.). ANOVA sonucuna göre;  $X_5$ ,  $X_4$  bağımsız değişkenlerinin ve istatistiksel modelin  $p$  değeri sırasıyla 0,022; 0,027 ve 0,041 olup istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir (Tablo 4.14.) Ayrıca, öğütme hızı ve öğütme süresinin  $p$  değeri 0,05’ten büyüktür, ancak bu parametrelere ilişkin  $p$  değerinin 0,07 olması nedeniyle önemli değişkenler olarak kabul edilmiştir.



**Şekil 4.19.** Sudaki çözünürlük ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ( $Y_4$ ) yanıt değişkeni için anlamlı bağımsız değişkenleri gösteren Pareto grafiği.

Sudaki çözünürlük ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ( $Y_4$ ) yanıt değişkeni için oluşturulan ana etkiler grafiği bağımsız değişkenlerin etkisinin yönü hakkında bilgi vermektedir (Şekil 4.20.). Bilya-toz ağırlık oranı, PVP:CXB ağırlık oranı, SLS:CXB ağırlık oranı ve MAN:CXB ağırlık oranındaki artış selekoksibin sudaki görünür çözünürlüğünün artmasını sağlarken; öğütme hızının ve öğütme süresinin artması çözünürlüğün azalmasına neden olmaktadır.



**Şekil 4.20.** Sudaki görünür çözünürlük ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ( $Y_4$ ) yanıt değişkeni için ana etki grafikleri.

Bağımsız değişkenlerin  $Y_4$  yanıt değişkeni üzerine etkilerini açıklayan doğrusal modele ilişkin çoklu regresyon denklemi aşağıda gibidir (Eşitlik 4.4.):

$$Y_4 = 3,14 - 0,00573X_1 - 0,478X_2 + 0,0867X_3 + 1,933X_4 + 10,17X_5 + 0,167X_6 \quad (4.4)$$

$Y_4$  yanıt değişkeni için kurulan modele ilişkin  $R^2$  değeri %86,77 olarak bulunmuştur, bu değer test edilen modelin veriler ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

#### 4.6. Mikronaltı/Nano Boyutta Selekoksib Bileşimlerinin Optimizasyonu: Merkezi Kompozit (*Central Composite*) Deney Tasarımı

Plackett-Burman deney tasarımına ilişkin ANOVA analizinin değerlendirilmesi sonucunda kritik formülasyon ve üretim işlem parametreleri belirlenmiştir. Düşük öğütme hızı ve kısa öğütme süresinin, çözünmüş selekoksib miktarını arttırmak için optimum işlem koşullarını sağladığı saptanmıştır. Bu nedenle optimizasyon deney tasarımında öğütme hızı ve öğütme süresi sırasıyla 250 devir/dk ve 1 saat olarak sabit tutulmuştur. Ayrıca bilya:toz oranının yüksek değerlerde olmasının daha düşük ortalama partikül büyüklüğü ve daha yüksek oranda çözünmüş selekoksib miktarı sağladığı deneysel çalışmalarla gösterildiği için bilya:toz oranı 15:1 olarak sabit tutulmuştur. Sonuç olarak, PVP:CXB, SLS:CXB ve MAN:CXB ağırlık oranlarının selekoksibin kritik kalite özelliklerini etkileyen kritik formülasyon parametreleri olduğuna karar verilmiştir. Bu üç bağımsız değişkenin yanıt değişkenler üzerine etkisinin anlaşılabilmesi için 3 etkenli, 5 düzeyli, 2 bloklü, alfa değeri 1,633 olan 8 küp noktası, küpte 4 merkez noktası, 6 eksen noktası ve eksenelde 2 merkez noktası içeren bir merkezi kompozit deney tasarımı uygulanmıştır. Deney tasarımı kapsamında 20 farklı formülasyon hazırlanmıştır.

Plackett-Burman deney tasarımında partikül büyüklüğü ( $Y_1$ ), pH 12'de 30. dakikada çözünmüş selekoksib miktarı ( $Y_2$ ), pH 1,2+±0,2 SLS'de 120. dakikada çözünmüş selekoksib miktarı ( $Y_3$ ) ve sudaki çözünürlük ( $Y_4$ ) yanıt değişkenleri değerlendirilmiştir. Ancak Plackett-Burman analiz sonuçlarının kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi sonucu merkezi kompozit deney tasarımındaki yanıt değişkenlerin pH 12'de 30. dakikada çözünmüş selekoksib miktarı ( $Y_1$ ), pH 1,2+±0,2 SLS'de 120. dakikada çözünmüş selekoksib miktarı ( $Y_2$ ) olmasına karar verilmiştir. İntresik çözünme hızı analiz sonuçları Tablo 4.15.'te verilmiştir.

**Tablo 4.15.** Merkezi kompozit deney tasarımı ile elde edilen yanıt değişken değerleri\*.

Formülasyon Kodu	Y <sub>1</sub> : pH 12'de 30. dakikada çözülmüş selekoksib miktarı (mg/500 mL)	Y <sub>2</sub> : pH 1,2+%0,2 SLS'de 120. dakikada çözülmüş selekoksib miktarı (mg/500 mL)
CC01	31,6	23,1
CC02	26,3	1,8
CC03	11,8	22
CC04	30	19,8
CC05	6,8	10,6
CC06	45,1	16,7
CC07	65,4	46
CC08	69,5	43,3
CC09	26	20
CC10	28	27,5
CC11	90	42,7
CC12	9,8	5
CC13	29	1,7
CC14	30	30
CC15	24	1,2
CC16	87	42,3
CC17	56,8	1,5
CC18	8,7	1
CC19	37,8	32,8
CC20	13,9	3,7

\*Design Expert® 13 yazılımında doğrudan ortalama değerlerin kullanılması ve bu değerler ile istatistiksel hesaplama yapılması nedeniyle tabloda sadece ortalama değerler sunulmuştur.

Merkezi kompozit deney tasarımına ilişkin deney sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi amacıyla model seçimi yapılmıştır ve ikinci dereceden/kuadratik modelin, bağımsız değişkenler ve yanıt değişkenleri arasındaki ilişkiyi en iyi şekilde açıkladığı bulunmuştur. Her yanıt için uygunluk özeti ve ANOVA analiz sonucu Tablo 4.16.'da verilmiştir. Yanıt değişkenlere ilişkin  $p$  değerleri değerlendirilmiş ve  $p$  değeri 0,05'ten küçük olan bağımsız değişkenler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

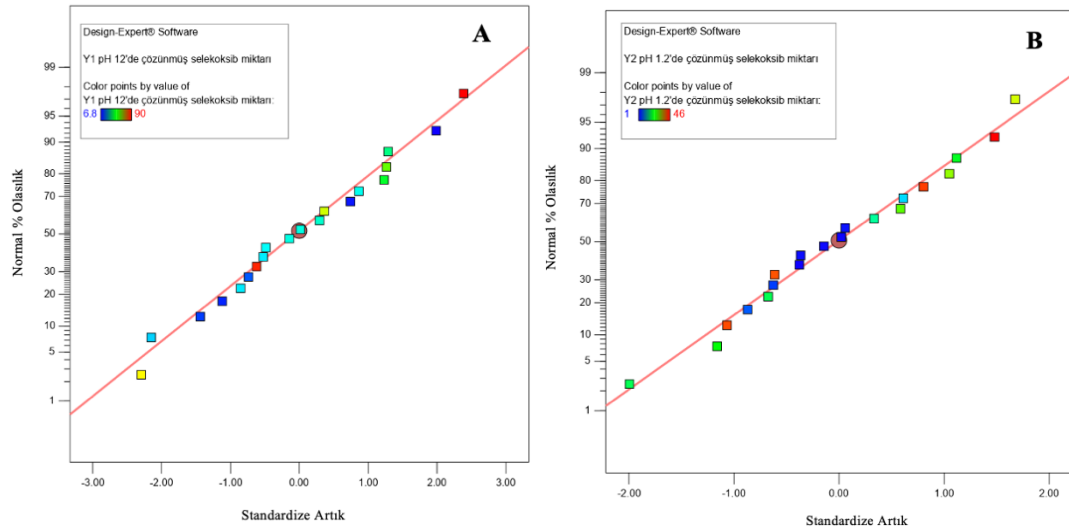
**Tablo 4.16.** İkinci dereceden/kuadratik modeldeki  $Y_1$  ve  $Y_2$  yanıt değişkenleri için varyans analizinin (ANOVA) özeti.

	<b>Y<sub>1</sub>: pH 12'de 30. dakikada Çözünmüş Selekoksib Miktarı (mg/500 mL)</b>				<b>Y<sub>2</sub>: pH 1,2%%0,2 SLS'de 120. dakikada Çözünmüş Selekoksib Miktarı (mg/500 mL)</b>			
	<b>Kareler Toplamı</b>	<b>Serbestlik Derecesi</b>	<b>F-değeri</b>	<b>p değeri</b>	<b>Kareler Toplamı</b>	<b>Serbestlik Derecesi</b>	<b>F-değeri</b>	<b>p değeri</b>
Model	11565,2	9	32,96	<0,0001	4361,28	9	11,76	0,0006
X <sub>1</sub> : PVP:CXB ağırlık oranı	7151,9	1	183,42	<0,0001	1281,16	1	31,096	0,0003
X <sub>2</sub> : SLS:CXB ağırlık oranı	1599,8	1	41,03	0,0001	1931,49	1	46,88	<0,0001
X <sub>3</sub> : MAN:CXB ağırlık oranı	728,8	1	18,69	0,0019	8,04	1	0,19	0,6691
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1255,0	1	32,19	0,0003	708,76	1	17,20	0,0025
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	3,6	1	0,09	0,7667	0,03	1	0,00	0,9786
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	220,5	1	5,66	0,0414	0,36	1	0,01	0,9274
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	135,4	1	3,47	0,0953	50,14	1	1,22	0,2986
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	489,7	1	12,56	0,0063	126,28	1	3,07	0,1139
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	2,5	1	0,06	0,8056	304,09	1	7,38	0,02376
<b>Kalıntı</b>	350,9	9			370,79	9		
<b>Uyum Eksikliği</b>	269,6	5	2,65	0,1829	274,79	5	2,29	0,2212
<b>Saf Hata</b>	81,3	4			96,01	4		
<b>Toplam</b>	11920,4	19			4875,31	19		
	R <sup>2</sup> =0,97				R <sup>2</sup> =0,92			

$Y_1$  yanıt değişkeni üzerinde en önemli bağımsız değişken PVP:CXB ağırlık oranı ( $X_1$ ) olmuştur. Bu tasarımda  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $X_1X_2$ ,  $X_2X_3$  ve  $X_2^2$  katsayıları en önemli/anlamli model katsayıları olmuştur. Çünkü bu değişkenlerin, etkileşimlerinin ve modelin istatistiksel varyans analizinden (ANOVA) elde edilen  $p$  değerleri 0,05'ten küçük bulunmuş olup istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir (Tablo 4.16.). Ayrıca modelin uyum eksikliği (*lack of fit*)  $p$  değeri 0,1829 olduğu için anlamlı bulunmamıştır. Modelin uyumu  $R^2$  ile değerlendirilmiştir.  $Y_1$  yanıt değişkeni için  $R^2$  değeri 0,97 bulunmuş, bu değer ile modelin uyumunun anlamlı olduğu gösterilmiştir. Modele ilişkin normal olasılık grafikleri Şekil 4.21.A'da verilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı olmayan uyum eksikliği değeri ve 1'e yakın  $R^2$  değeri model uyumunun gözlemlenen ve tahmin edilen değerler arasındaki belirleme katsayısı kullanılarak değerlendirildiğini göstermektedir.

$Y_2$  yanıt değişkeni üzerinde en önemli bağımsız değişken SLS:CXB ağırlık oranı ( $X_2$ ) olmuştur. Bu tasarımda  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_1X_2$  ve  $X_3^2$  katsayıları en önemli/anlamli model katsayıları olmuştur. Bu değişkenlerin, etkileşimlerinin ve modelin istatistiksel varyans analizinden (ANOVA) elde edilen  $p$  değerleri 0,05'ten küçük bulunmuş olup istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir (Tablo 4.16). MAN:CXB ağırlık oranı istatistiksel olarak anlamlı değildir; ancak bu değişkene ilişkin kuadratik etkinin  $Y_2$  değişkeni üzerindeki etkisi anlamlı bulunmuştur. Ayrıca modelin uyum eksikliği,  $p$  değeri 0,2212 olduğu için anlamlı bulunmamıştır. Modelin uyumu  $R^2$  ile değerlendirilmiştir.  $Y_2$  yanıt değişkeni için  $R^2$  değeri 0,92 bulunmuş, bu değer ile modelin uyumunun anlamlı olduğu gösterilmiştir. Modele ilişkin normal olasılık grafikleri Şekil 4.21.B'de verilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı olmayan uyum eksikliği değeri ve 1'e yakın  $R^2$  değeri model uyumunun gözlemlenen ve tahmin edilen değerler arasındaki belirleme katsayısı kullanılarak değerlendirildiğini göstermektedir.





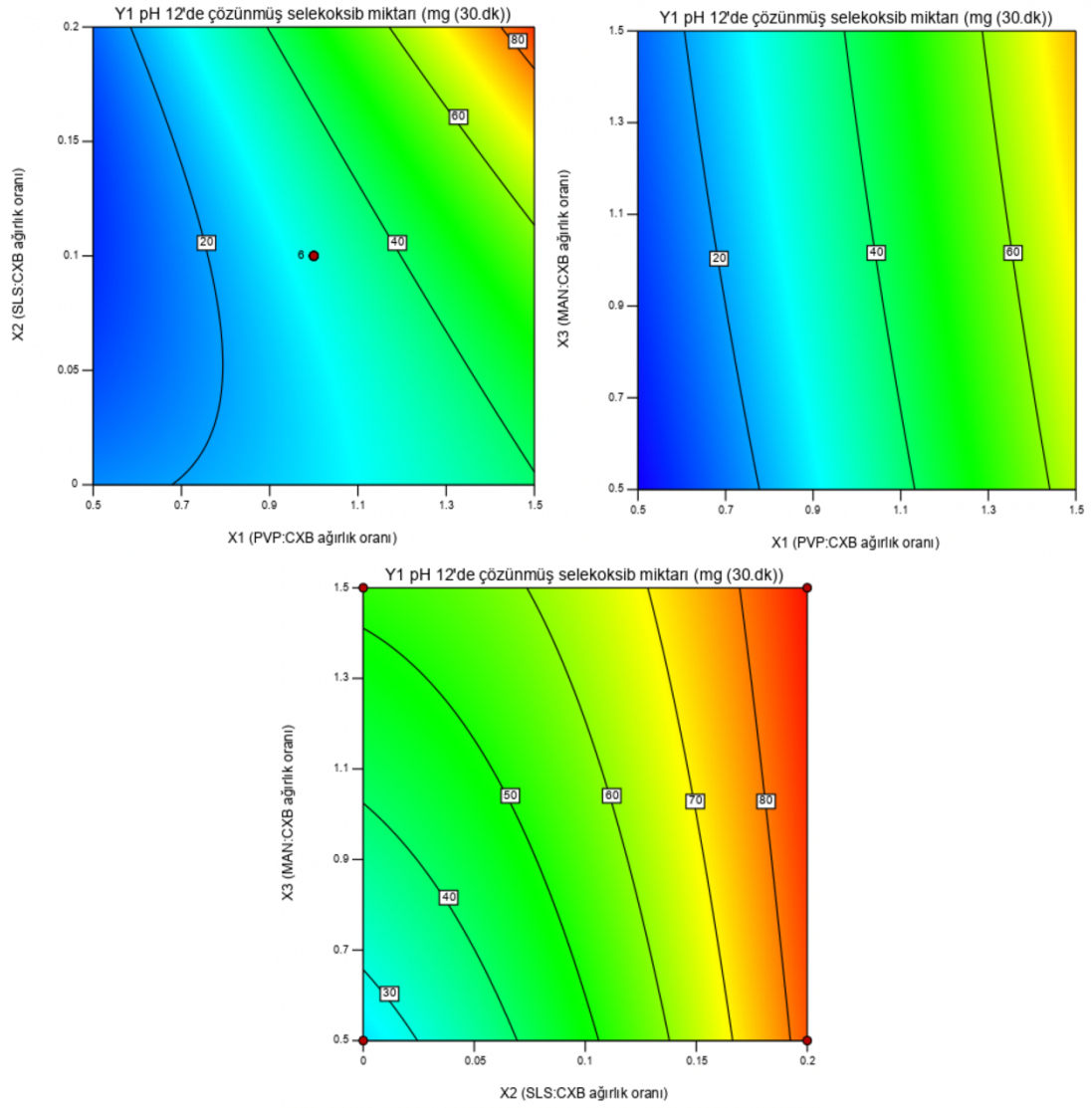
**Şekil 4.21.** Modele ilişkin normal olasılık grafikleri: A;  $Y_1$  yanıt değişkeni, B;  $Y_2$  yanıt değişkeni.

Verilerin çoklu doğrusal regresyon analizinden sonra, incelenen bağımsız değişkenlerin nicel etkisini ve yanıtlar üzerindeki etkileşimlerini açıklayan polinomial model denklemleri oluşturulmuştur.  $Y_1$  yanıt değişkeni için oluşturulan denklem Eşitlik 4.5. ile,  $Y_2$  yanıt değişkeni için oluşturulan denklem Eşitlik 4.6. ile gösterilmiştir.

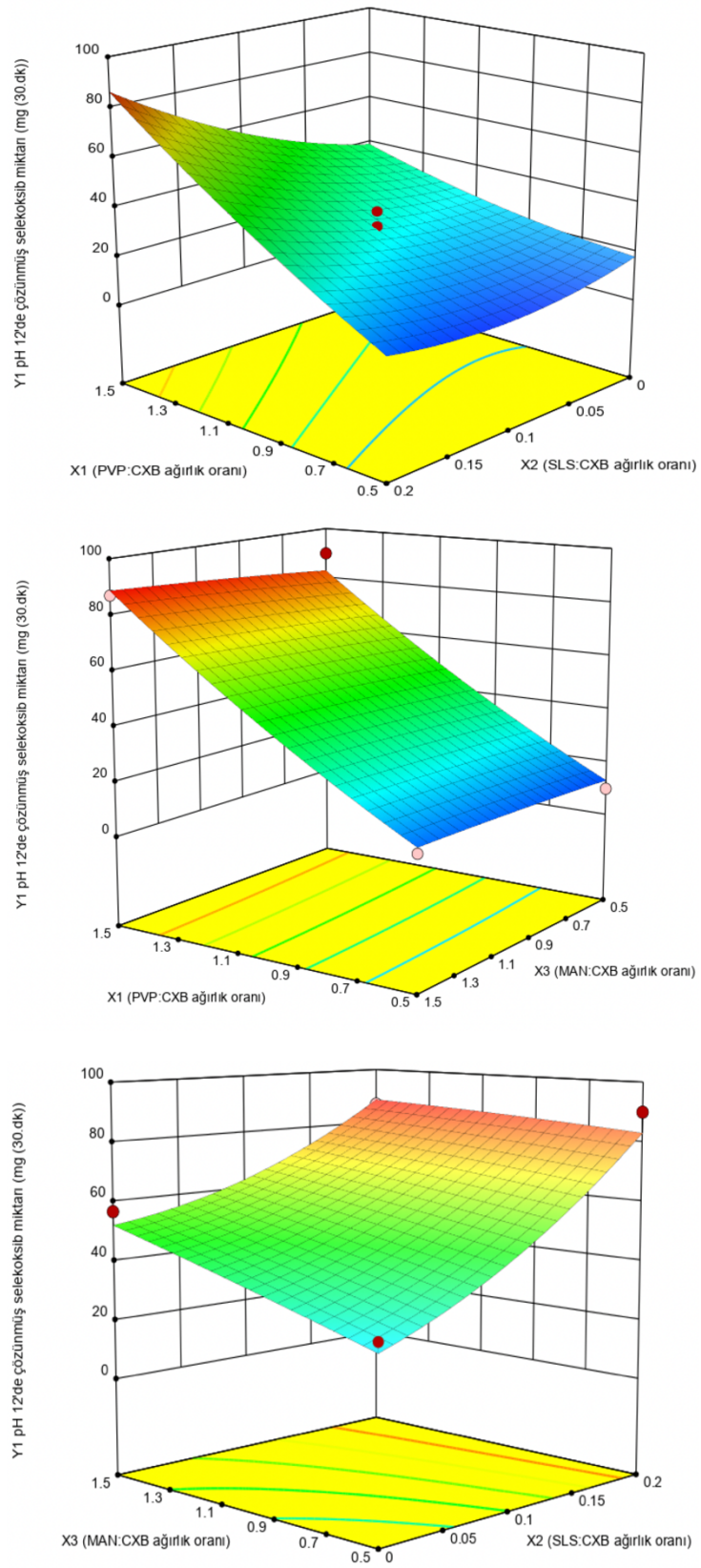
$$Y_1 = -7.3 - 7.0 \times X_1 - 157.8 \times X_2 + 26.1 \times X_3 + 250.5 \times X_1X_2 + 2.7 \times X_1X_3 - 105.0 \times X_2X_3 + 12.8 \times X_1^2 + 608.9 \times X_2^2 - 1.7 \times X_3^2 \quad (4.5)$$

$$Y_2 = -14.8 + 16.1 \times X_1 + 1.8 \times X_2 + 37.0 \times X_3 + 188.2 \times X_1X_2 + 0.25 \times X_1X_3 - 4.3 \times X_2X_3 - 7.79 \times X_1^2 - 309.2 \times X_2^2 - 19.19 \times X_3^2 \quad (4.6)$$

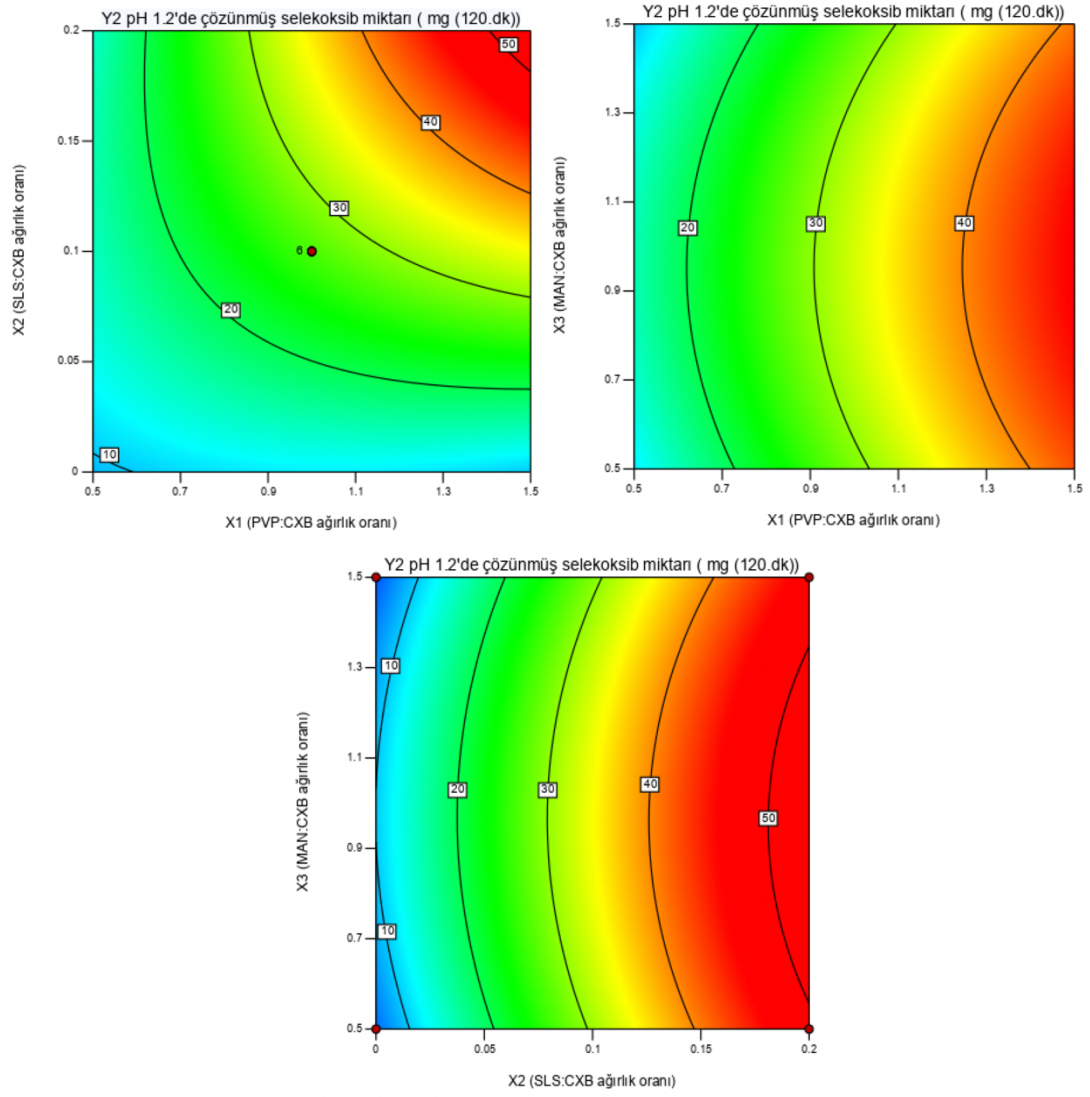
Üç boyutlu cevap yüzey ve kontur grafikleri, yanıt değişkenler üzerinde anlamlı etkiye sahip bağımsız değişkenlerin etkisini daha ayrıntılı değerlendirebilmek için oluşturulmuş ve veriler grafikler ile görselleştirilmiştir. Farklı formülasyon değişkenleri arasındaki etkileşimlerin  $Y_1$  yanıt değişkeni üzerine etkisini gösteren kontur grafikleri Şekil 4.22.'de, üç boyutlu cevap yüzeyi grafikleri Şekil 4.23.'te;  $Y_2$  yanıt değişkeni üzerine etkisini gösteren kontur grafikleri Şekil 4.24.'te ve üç boyutlu cevap yüzeyi grafikleri Şekil 4.25.'te verilmiştir.



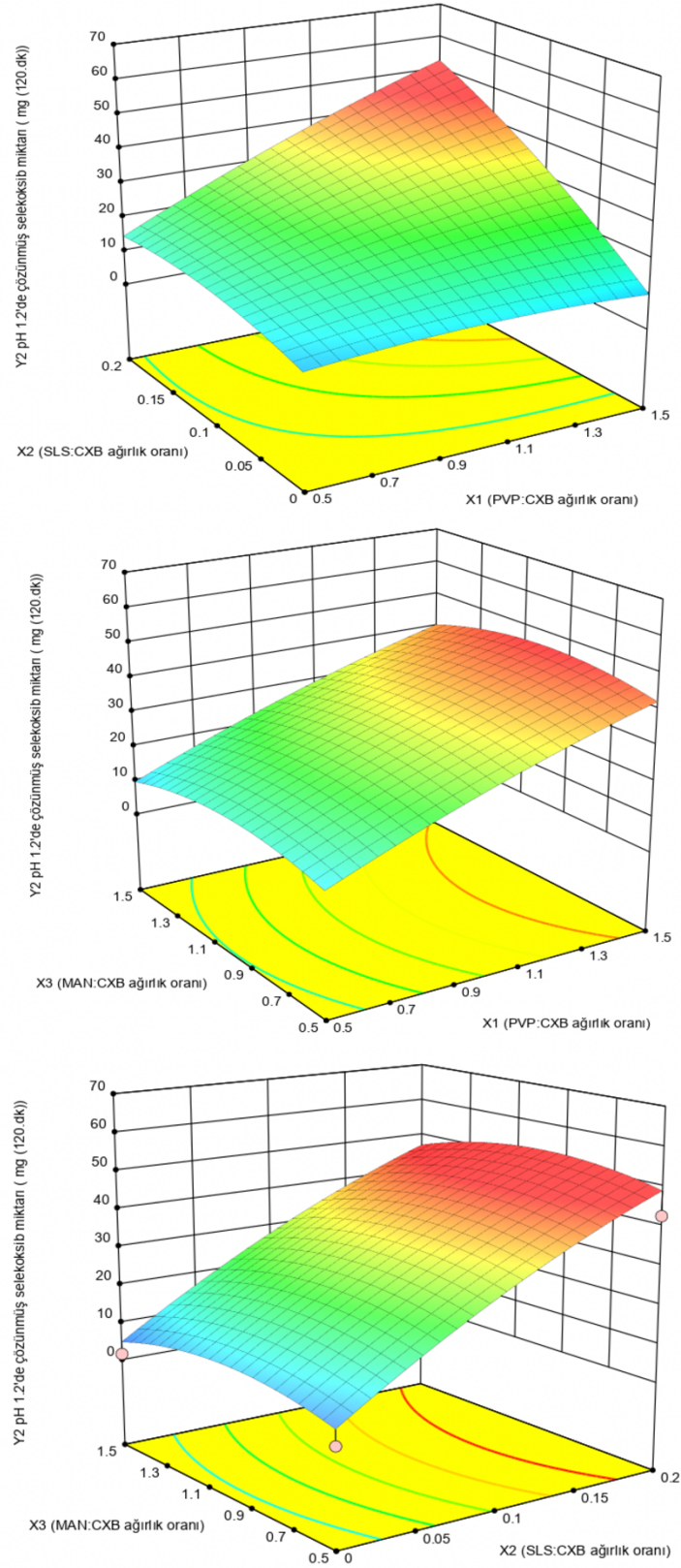
Şekil 4.22.  $X_1$ ,  $X_2$  ve  $X_3$  bağımsız değişkenleri arasındaki etkileşimlerin  $Y_1$  yanıt değişkeni üzerine etkisini gösteren kontur grafikleri.



**Şekil 4.23.**  $X_1$ ,  $X_2$  ve  $X_3$  bağımsız değişkenleri arasındaki etkileşimlerin  $Y_1$  yanıt değişkeni üzerine etkisini gösteren üç boyutlu cevap yüzey grafikleri.



Şekil 4.24.  $X_1$ ,  $X_2$  ve  $X_3$  bağımsız değişkenleri arasındaki etkileşimlerin  $Y_2$  yanıt değişkeni üzerine etkisini gösteren kontur grafikleri.



Şekil 4.25.  $X_1$ ,  $X_2$  ve  $X_3$  bağımsız değişkenleri arasındaki etkileşimlerin  $Y_2$  yanıt değişkeni üzerine etkisini gösteren üç boyutlu cevap yüzeyi grafikleri.

### **Model Validasyonu ve Optimum Formülasyon Seçimi**

Ön tarama ve optimizasyon deney tasarımlarının temel amacı; selekoksibin çözünürlüğünü ve çözünme hızını arttırmak ve aynı zamanda ortalama partikül büyüklüğünü küçültmek için optimum ve en iyi formülasyon ve işlem parametrelerini belirlemektir. Birlikte öğütme çalışmaları için en uygun yardımcı maddeler ön tarama deneyleri ile belirlenmiştir ve ardından kritik formülasyon ve işlem değişkenlerinin belirlenmesi için faktöriyel deney tasarımı kullanılmıştır. Faktöriyel tasarım ile belirlenen en etkili formülasyon değişkenleri ve bunların etkileşimi merkezi kompozit deney tasarımı ile üç düzeyde incelenmiştir. Bağımsız değişkenlerin cevap değişkenler üzerine etkisini açıklayan matematiksel modeller kurulduktan sonra pH 12 ve pH 1,2+%0,2 SLS çözünme ortamlarında hedeflenen çözünmüş selekoksib miktarı sırasıyla >70 mg/500 mL ve >40 mg/500 mL olmuştur. Tasarım alanı oluşturulması ile arzu edilirlilik (*desirability*) fonksiyonuna sahip optimum formülasyon belirlenmiştir. Tasarım alanı üzerinden kazanılan bilgi ve deneyim sayesinde PVP:CXB oranı en yüksek 1,5 seviyesinde, SLS:CXB oranı 0,15 ile 0,20 arasında ve MAN:CXB oranı en düşük, orta ve en yüksek 3 düzeyde tasarlanmıştır. Yapılan deneylere ilişkin hata ve arzu edilirlilik değerleri ile bu konfigürasyonların deneysel ve tahmin sonuçları Tablo 4.17.'de verilmiştir. Optimum formülasyonun pH 12 ve pH 1,2+%0,2 SLS çözünme ortamlarına ek olarak FASSIF çözünme ortamında da intrinsik çözünme hızı testi yapılmıştır. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda optimum formülasyondaki PVP:CXB, SLS:CXB ve MAN:CXB ağırlık oranları sırasıyla 1,5; 0,2; 0,5 olmuştur.

**Tablo 4.17.** Arzu edilirlilik fonksiyonuna dayalı optimum birlikte öğütülmüş selekoksib formülasyonuna ilişkin deneysel ve öngörülen sonuçları.

Formülasyon Denemesi	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Deneysel ve Öngörülen Sonuçlar	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>
1	1,6	0,15	1,0	Tahmin edilen	77,3	46,6
				Deneysel	83,2	49,1
				Hata (%)	7,63	5,3
				Arzu edilirlilik	0,85	
2	1,5	0,2	1,5	Tahmin edilen	88,6	47,2
				Deneysel	87,0	42,3
				Hata (%)	1,8	10,3
				Arzu edilirlilik	0,91	
3*	1,5	0,2	0,5	Tahmin edilen	83,1	49,1
				Deneysel	90,0	47,2
				Hata (%)	8,3	3,8
				Arzu edilirlilik	0,90	

\*3 numaralı deneme, optimum formülasyonu temsil etmektedir.

#### 4.7. Mikronaltı/Nano-boyutta Selekoksis Bileşimlerinin Optimizasyonu: Bayes Optimizasyonu

Bayes optimizasyonunda, Gauss süreci vekil modelini başlatmak üzere merkezi kompozit deney tasarımında yer alan 8 deney ve bu deneylere ilişkin Y<sub>2</sub> (pH 1,2+%0,2 SLS'de 120. dakikada çözülmüş selekoksis miktarı) yanıt değişkeni verileri kullanılmıştır (Tablo 3.10.). Bu veriler ile BO deney tasarımının ilk 2 deneyi belirlenmiştir. BO01 ve BO02 kodlu formülasyonların intrinsik çözünme hızı testleri yapılmış, Y<sub>2</sub> yanıt değişkeni değeri tespit edilmiştir. Bu iki formülasyona ilişkin deney sonuçları ile vekil modelden Beklenen İyileştirme (EI) ve Güven Sınırı (CB) edinme fonksiyonları kullanılarak yeni 2 deney için girdi önerisi alınmıştır. Ardından modelin önerdiği BO03 ve BO04 deneyleri yapılmıştır. Benzer şekilde her yinelemede iki deney yapılmış ve toplam 6 yinelemede deney tasarımı tamamlanmıştır. Tablo 4.18.'de BO tarafından önerilen kümülatif deney tasarım matrisi ve Y<sub>2</sub> yanıt değişkenine ilişkin sonuçlar verilmiştir.

BO sonuçlarına bakıldığında BO07'den itibaren, X<sub>1</sub> ve X<sub>2</sub> değişkenlerinde edinme fonksiyonunun çok büyük değişiklik yapmadığı ve daha çok "yararlanma"

stratejisi göttüğü,  $X_3$  değişkeninde “keşfetme” stratejisi izlediği gözlenebilir. BO, optimum formülasyona ulaşmak için “yararlanma” ve “keşfetme” stratejileri ile BO07’den itibaren  $X_1$  için 1,56 - 2 aralığını,  $X_2$  için 0,14 - 0,175 aralığını,  $X_3$  için 0,5 – 1,95 aralığını taramıştır. BO07’den itibaren BO’nun, merkezi kompozit deney tasarımı ile de belirlenen optimum birlikte öğütölmüş selekoksib formülasyonuna çok yakın formülasyon bileşimleri önerdiği görölmüştür.

**Tablo 4.18.** BO tarafından önerilen deney tasarımına ilişkin analiz sonuçları.

Formülasyon Kodu	Bağımsız Değişkenler			Yanıt Değişken*
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$Y_2$
BO01	1,23	0,14	0,79	45,0
BO02	1,92	0,02	0,64	1,7
BO03	0,81	0,19	1,13	16,4
BO04	1,63	0,15	1,04	49,1
BO05	1,44	0,16	0,9	47,8
BO06	1,55	0,05	1,28	9,6
BO07	1,99	0,175	0,81	46,2
BO08	1,56	0,156	0,85	46,1
BO09	1,85	0,16	1,95	36,0
BO10	1,7	0,16	0,9	48,5
BO11	1,9	0,16	1,2	48,0
BO12	2	0,14	0,5	48,4

\*R yazılımında doğrudan ortalama değerlerin kullanılması nedeniyle tabloda sadece ortalama değerler sunulmuştur.

#### 4.8. Mikronaltı/Nano Boyutta Selekoksib Bileşimlerinin Karakterizasyonu

##### 4.8.1. Çözünürlük

Merkezi kompozit deney tasarımı ile optimize edilen optimum birlikte öğütölmüş selekoksib bileşimi, bu bileşime ilişkin fiziksel karışım, işlem görmemiş selekoksib etkin maddesi ve referans ürün Celebrex® Kapsül için çözünürlük deneyleri yapılmıştır. %0,2 oranında SLS içeren pH 1,2; pH 4,5; pH 6,8 ortamları ve saf su ortamında yapılan çözünürlük deneylerine ilişkin karşılaştırmalı veriler Tablo 4.19.’da, çubuk grafikleri ise Şekil 4.26.’da verilmiştir.

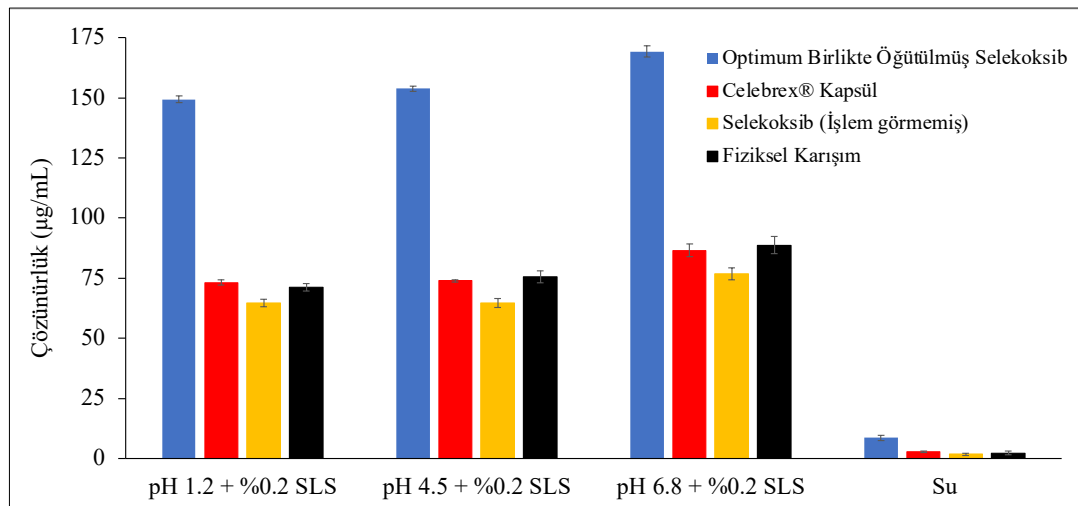


**Tablo 4.19.** Optimum birlikte öğütülmüş selekoksib bileşimi, fiziksel karışım, işlem görmemiş selekoksib etkin maddesi ve Celebrex® Kapsül çözünürlük sonuçları ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Formülasyon	pH 1,2+%0,2 SLS	pH 4,5+%0,2 SLS	pH 6,8+%0,2 SLS	Saf su
Optimum birlikte öğütülmüş selekoksib bileşimi	149,3±1,4	153,9±1,1	169,2±2,3	8,6±1,1
Fiziksel Karışım	71,2±1,56	75,5±2,4	88,7±3,61	2,3±0,8
Selekoksib (İşlem görmemiş)	64,8±1,6	64,7±1,8	76,8±2,4	1,8±0,5
Celebrex® Kapsül	73,2±1,2	73,9±0,6	86,5±2,6	2,8±0,4

$n = 3$ , sonuçlar ortalama±standart sapmaları olarak sunulmuştur.

Optimum birlikte öğütülmüş selekoksibin çözünürlüğü, işlem görmemiş selekoksib ile kıyaslandığında pH 1,2+%0,2 SLS, pH 4,5+%0,2 SLS ve pH 6,8+%0,2 SLS çözünme ortamlarında 2 kat; saf su çözünme ortamında ise 4,8 kat artırılmıştır ( $p < 0.05$ , Mann-Whitney analizi). Aynı zamanda, optimum birlikte öğütülmüş selekoksibin tüm çözünme ortamlarındaki çözünürlüğü referans ürün Celebrex® Kapsül'den daha yüksektir ( $p < 0.05$ , Mann-Whitney analizi). Diğer yandan, öğütme bileşimindeki yardımcı maddelerin içeriğinin etkisi nedeniyle fiziksel karışımın çözünürlüğü kabul edilebilir değerlerdedir. Fiziksel karışımındaki selekoksibin sudaki çözünürlüğü  $2,3 \pm 0,62 \mu\text{g/mL}$  iken işlem görmemiş selekoksibin sudaki çözünürlüğü  $1,8 \pm 0,33 \mu\text{g/mL}$ 'dir ( $p > 0.05$ , Mann-Whitney analizi).



**Şekil 4.26.** Optimum birlikte öğütülmüş selekoksib bileşimi, fiziksel karışım, işlem görmemiş selekoksib etkin maddesi ve Celebrex® Kapsül çözünürlük sonuçlarına ilişkin karşılaştırmalı çubuk grafikleri ( $n = 3$ , hata çubukları standart sapmaları göstermektedir).

#### 4.8.2. İntrensik Çözünme Hızı

Selekoksinin çözünme akışı, sabit yüzey alanından çözünme hızı ile tayin edilmiştir. İntrensik çözünme hızı testinde,  $0,5 \text{ cm}^2$ 'lik sabit çözünme yüzey alanından birim zamanda çözülmüş selekoksin miktarı belirlenmiştir. 500 mL, pH 1,2+±0,2 SLS, pH 4,5+±0,2 SLS, pH 6,8+±0,2 SLS, pH 12 ve FASSIF çözünme ortamlarında birim zamanda  $0,5 \text{ cm}^2$ 'lik yüzey alanından çözülmüş selekoksin miktarları Tablo 4.20., 4.21., 4.22., 4.23. ve 4.24.'te verilmiştir. Optimum birlikte öğütülmüş selekoksin bileşimi, fiziksel karışım, işlem görmemiş selekoksin etkin maddesi ve Celebrex® Kapsül için sabit yüzey alanından zamana karşı çözülmüş selekoksin miktarı verileri kullanılarak basit doğrusal regresyon analizi uygulanmış ve regresyon denklemleri oluşturulmuştur (Şekil 4.27.). Regresyon grafikleri ve denklemleri, doğrusal bir grafik elde edebilmek amacıyla pH 1,2+±0,2 SLS, pH 4,5+±0,2 SLS ve pH 6,8+±0,2 SLS için ilk 15 dakika sonuçları; pH 12 için ise daha hızlı çözünme profilinden dolayı ilk 5 dakika sonuçları kullanılarak oluşturulmuştur. Oluşturulan regresyon doğrularının eğimi ve  $0,5 \text{ cm}^2$ 'lik yüzey alanı ile Eşitlik 2.5.'te verilen formüle göre hesaplanan IDR değerleri Tablo 4.25.'te verilmiştir. pH 1,2+±0,2 SLS, pH 4,5+±0,2 SLS ve pH 6,8+±0,2 SLS çözünme ortamlarındaki karşılaştırmalı intrinsik çözünme hızı grafikleri Şekil 4.28.'de, FASSIF çözünme ortamındaki karşılaştırmalı intrinsik çözünme hızı grafiği Şekil 4.29.'da verilmiştir.

**Tablo 4.20.** 500 mL pH 1,2+<sup>±</sup>0,2 SLS çözünme ortamında çözünmüş selekoksib miktarı (mg).

Numune Adı	Örnekleme Zamanı (dakika)									
	0	3	6	9	12	15	30	60	90	120
Optimum Birlikte Öğütülmüş Selekoksib	0,0	8,5±0,3	18,7±1,2	27,5±3,6	37,7±2,8	44,1±4,3	45,6±3,9	47,2±3,5	49,0±2,6	49,5±1,9
Celebrex® Kapsül	0,0	1,9±0,4	4,8±0,5	8,2±0,8	11,3±1,2	14,3±1,7	21,1±1,4	30,4±1,1	34,9±1,9	36,0±2,3
Selekoksib (İşlem Görmemiş)	0,0	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,4	0,8
Fiziksel Karışım	0,0	0,9±0,3	1,7±0,4	2,3±0,4	2,9±0,6	3,8±0,9	4,6±1,2	6,3±1,7	8,8±2,5	10,9±2,8

$n = 3$ , sonuçlar ortalama±standart sapmaları olarak sunulmuştur.

**Tablo 4.21.** 500 mL pH 4,5+<sup>±</sup>0,2 SLS çözünme ortamında çözünmüş selekoksib miktarı (mg).

Numune Adı	Örnekleme Zamanı (dakika)									
	0	3	6	9	12	15	30	60	90	120
Optimum Birlikte Öğütülmüş Selekoksib	0,0	9,8±1,0	20,1±2,0	28,9±3,0	39,2±4,2	46,3±2,4	47,3±1,7	47,9±2,2	48,3±1,9	49,5±2,1
Celebrex® Kapsül	0,0	6,9±0,4	12,6±0,9	17,7±1,2	23,8±1,2	27,2±2,3	28,6±3,1	30,9±1,9	33,4±3,5	36,1±2,9
Selekoksib (İşlem Görmemiş)	0,0	0,2±0,1	0,3±0,1	0,4±0,2	0,4±0,2	0,5±0,2	0,9±0,4	1,4±0,6	1,6±0,8	2,3±0,7
Fiziksel Karışım	0,0	1,1±0,5	1,9±0,9	2,5±0,4	3,3±1,2	3,9±1,4	4,6±2,1	6,1±1,9	9,0±2,8	11,1±3,1

$n = 3$ , sonuçlar ortalama±standart sapmaları olarak sunulmuştur.

**Tablo 4.22.** 500 mL pH 6,8+<sup>±</sup>0,2 SLS çözünme ortamında çözünmüş selekoksib miktarı (mg).

Numune Adı	Örnekleme Zamanı (dakika)									
	0	3	6	9	12	15	30	60	90	120
Optimum Birlikte Öğütülmüş Selekoksib	0,0	9,3±0,5	20,7±2,1	30,0±3,3	40,4±1,9	47,7±3,5	49,5±3,1	51,1±2,9	52,7±2,4	54,2±1,9
Celebrex® Kapsül	0,0	9,5±1,3	17,7±2,1	24,4±3,5	30,0±4,1	34,1±2,2	37,2±1,8	38,8±2,7	40,9±3,6	41,5±4,2
Selekoksib (İşlem Görmemiş)	0,0	0,1±0,1	0,2±0,1	0,3±0,2	0,4±0,3	0,5±0,3	1,1±0,4	1,6±0,6	2,1±0,6	2,5±0,9
Fiziksel Karışım	0,0	1,5±0,4	2,3±1,1	2,8±1,5	3,6±1,2	4,4±0,9	5,2±1,8	6,7±2,1	9,2±2,8	11,4±3,1

$n = 3$ , sonuçlar ortalama±standart sapmaları olarak sunulmuştur.

**Tablo 4.23.** 500 mL pH 12 çözünme ortamında çözünmüş selekoksib miktarı (mg).

Numune Adı	Örnekleme Zamanı (dakika)									
	0	1	2	3	4	5	10	20	30	60
Optimum Birlikte Öğütülmüş Selekoksib	0,0	3,6±1,1	10,4±2,6	19,2±3,1	26,0±2,6	32,0±3,7	52,4±3,6	74,2±2,9	81,9±3,1	89,1±2,9
Celebrex® Kapsül	0,0	4,5±1,6	7,5±3,4	10,6±1,9	13,6±2,2	15,5±2,8	21,9±3,2	32,6±2,6	41,5±3,8	48,8±3,3
Selekoksib (İşlem Görmemiş)	0,0	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,9±0,2	1,8±0,3	2,1±0,6	4,1±0,7
Fiziksel Karışım	0,0	0,6±0,3	1,1±0,6	1,9±1,1	2,6±1,4	3,3±1,7	4,8±2,2	6,4±1,4	8,9±1,9	12,0±2,1

$n = 3$ , sonuçlar ortalama±standart sapmaları olarak sunulmuştur.

**Tablo 4.24.** 500 mL FASSIF çözünme ortamında çözünmüş selekoksib miktarı (mg).

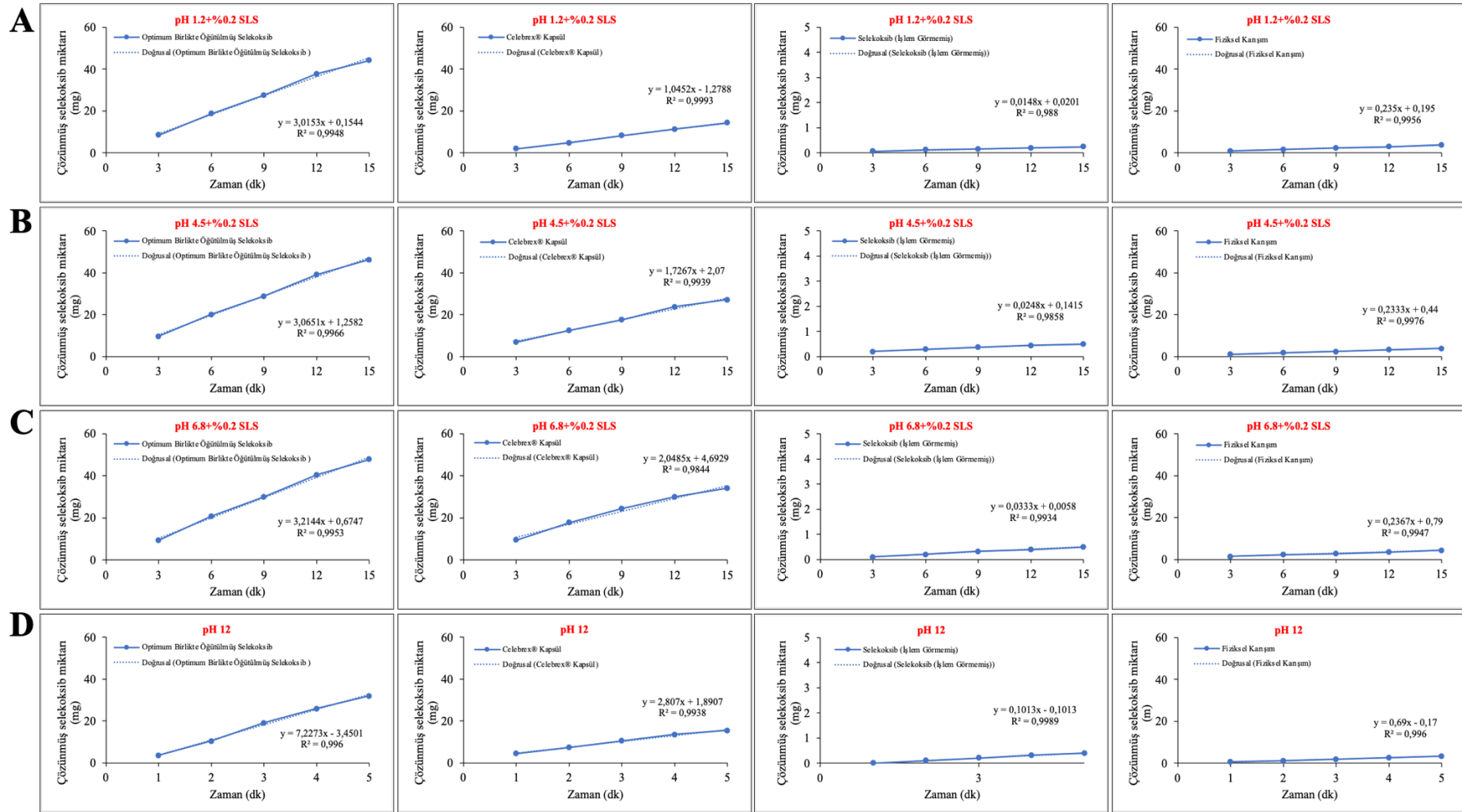
Numune Adı	Örnekleme Zamanı (dakika)					
	0	15	30	60	90	120
Optimum Birlikte Öğütülmüş Selekoksib	0,0	27,0±1,4	30,0±1,7	31,3±2,0	32,3±2,8	33,8±3,3
Celebrex® Kapsül	0,0	10,9±0,9	14,7±1,4	16,7±1,5	19,3±2,1	20,8±2,4

$n = 3$ , sonuçlar ortalama±standart sapmaları olarak sunulmuştur.

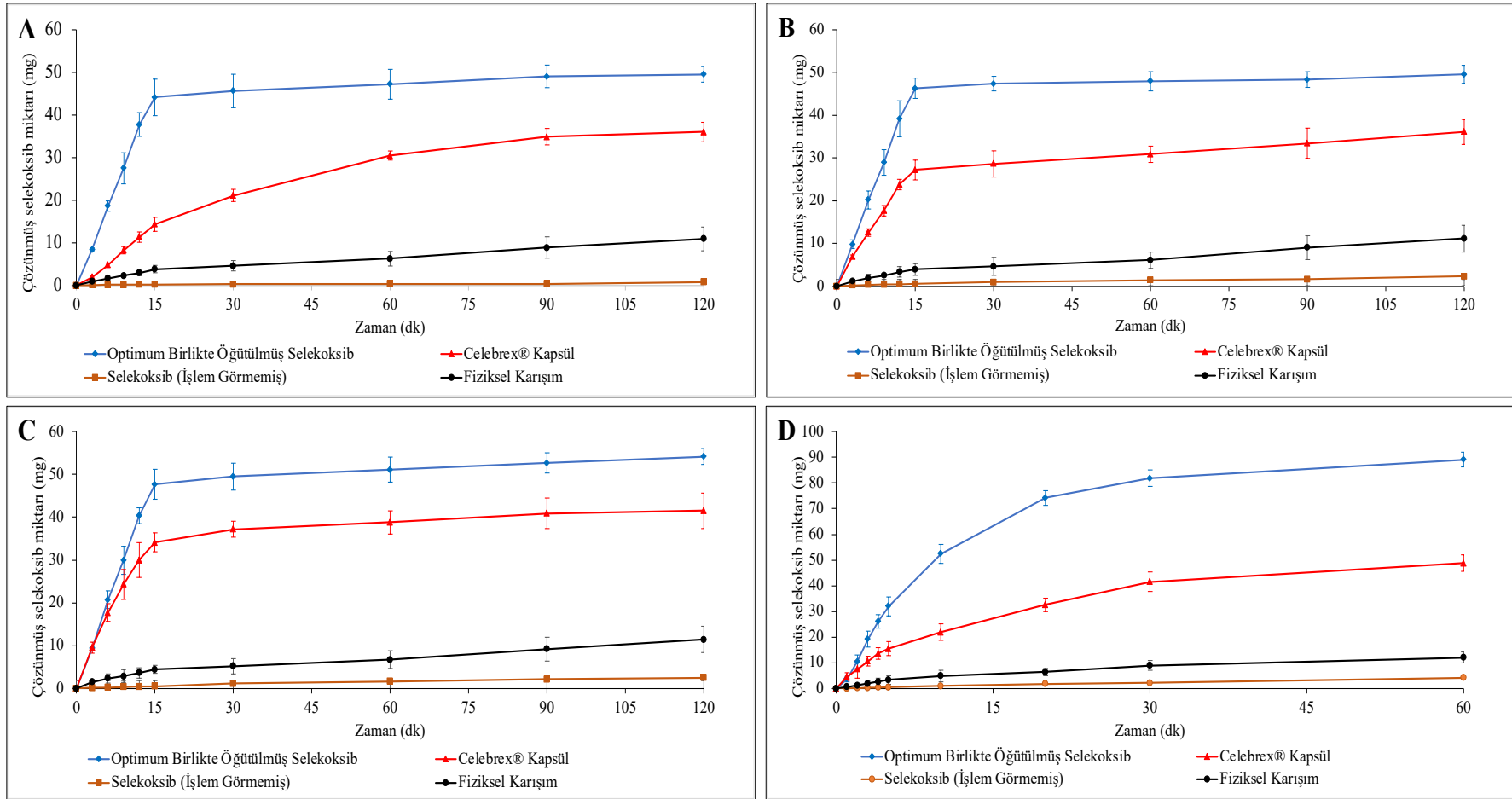
**Tablo 4.25.** pH 1,2+±0,2 SLS, pH 4,5+±0,2 SLS, pH 6,8+±0,2 SLS ve pH 12'de selekoksibin intrinsik çözünme hızı (mg/dk/cm<sup>2</sup>).

Formülasyon	Çözünme Ortamı			
	pH 1,2+±0,2 SLS	pH 4,5+±0,2 SLS	pH 6,8+±0,2 SLS	pH 12
Optimum birlikte öğütülmüş selekoksib	6,0307	6,1302	6,4287	14,455
Celebrex® Kapsül	2,0904	3,4533	4,0971	5,6141
Selekoksib (İşlem görmemiş)	0,0296	0,0497	0,0667	0,25
Fiziksel Karışım	0,47	0,4667	0,4733	1,38

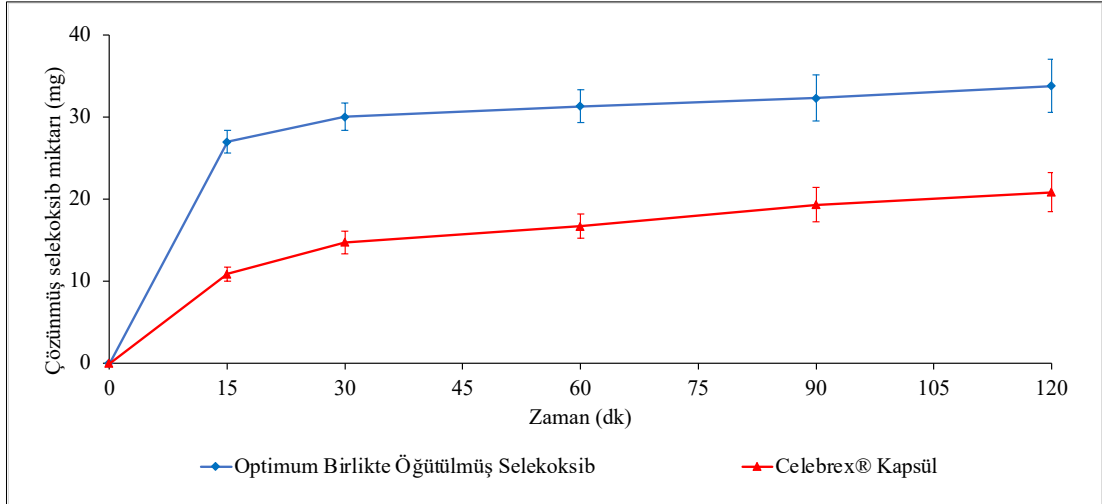
$n = 3$ , sonuçlar ortalama±standart sapmaları olarak sunulmuştur.



**Şekil 4.27.** İntrensik çözünme hızı deneylerine ilişkin regresyon grafikleri ve denklemleri (A: pH 1,2+±0,2 SLS, B: pH 4,5+±0,2 SLS, C: pH 6,8+±0,2 SLS ve D: pH 12).



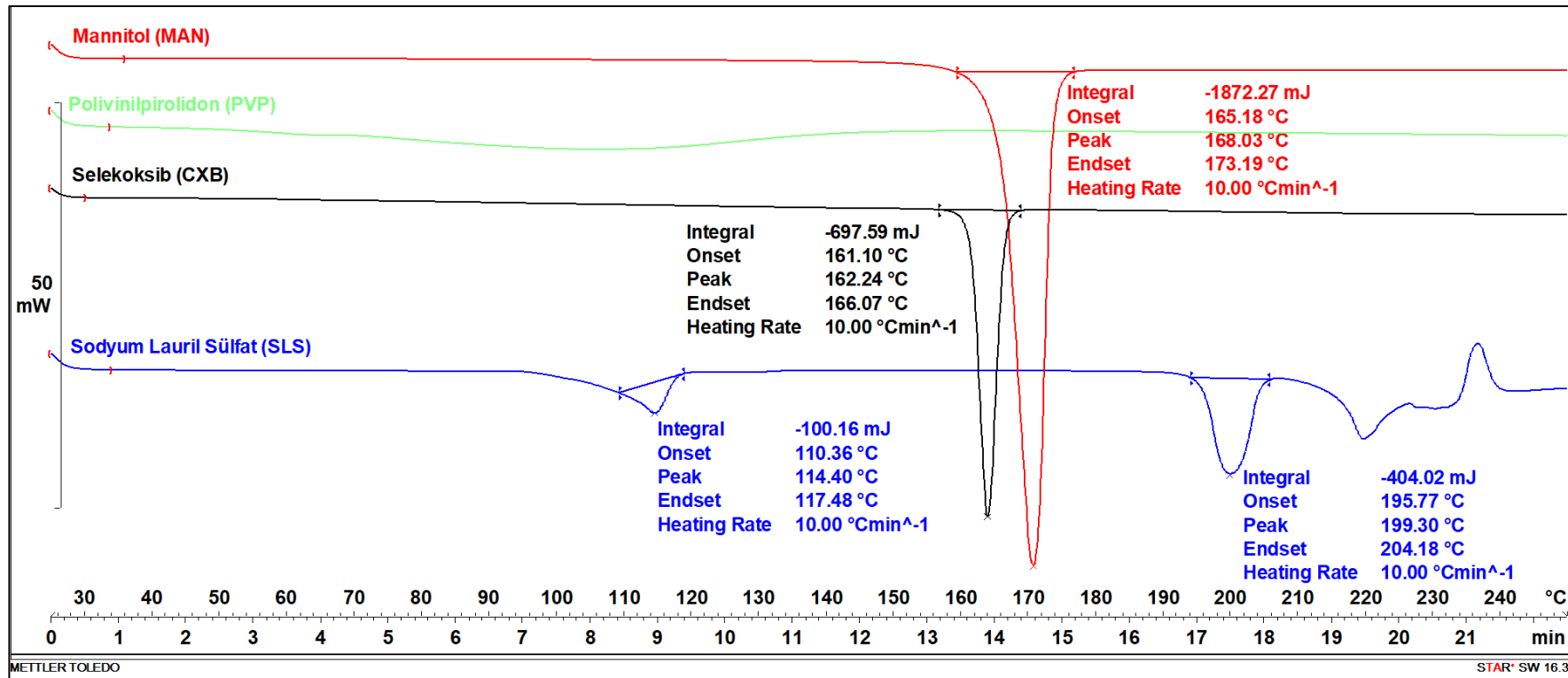
**Şekil 4.28.** Karşılaştırmalı intrinsik çözünme hızı grafikleri (A: pH 1,2+%0,2 SLS, B: pH 4,5+%0,2 SLS, C: pH 6,8+%0,2 SLS, D: pH 12 (mg/500 mL) ( $n = 3$ , hata çubukları standart sapmaları göstermektedir).



**Şekil 4.29.** FASSIF çözünme ortamında karşılaştırmalı intrinsik çözünme hızı grafiği (mg/500 mL) ( $n = 3$ , hata çubukları standart sapmaları göstermektedir).

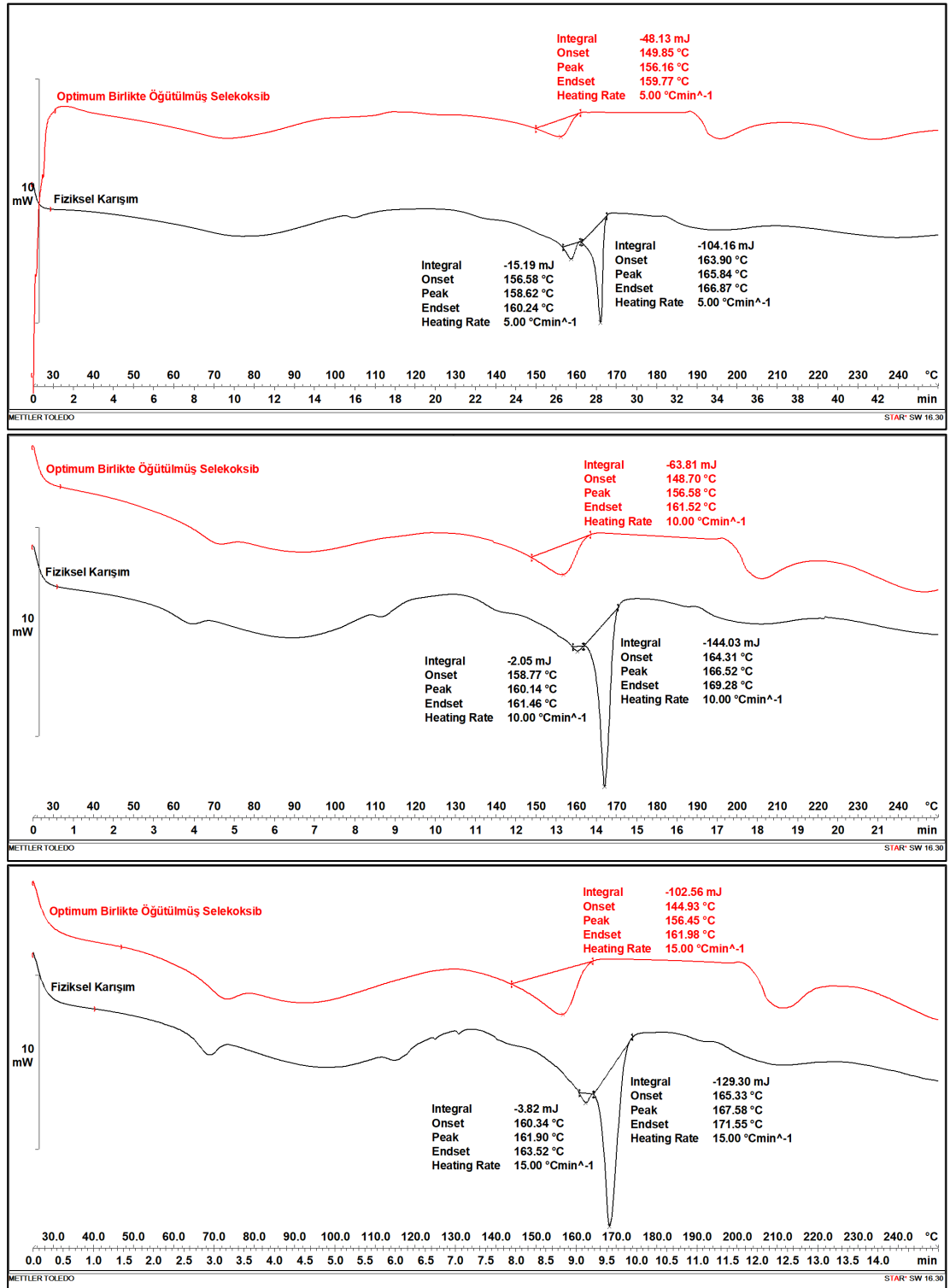
#### 4.8.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)

Öğütme bileşiminde yer alan her bir maddeye ilişkin termogramlar Şekil 4.30.'da verilmiştir. Farklı sıcaklık artışlarında optimum birlikte öğütülmüş selekoksib ve fiziksel karışıma ilişkin termogramlar Şekil 4.31.'de verilmiştir.



Şekil 4.30. Öğütme bileşiminde yer alan maddelerin DSC termogramları.

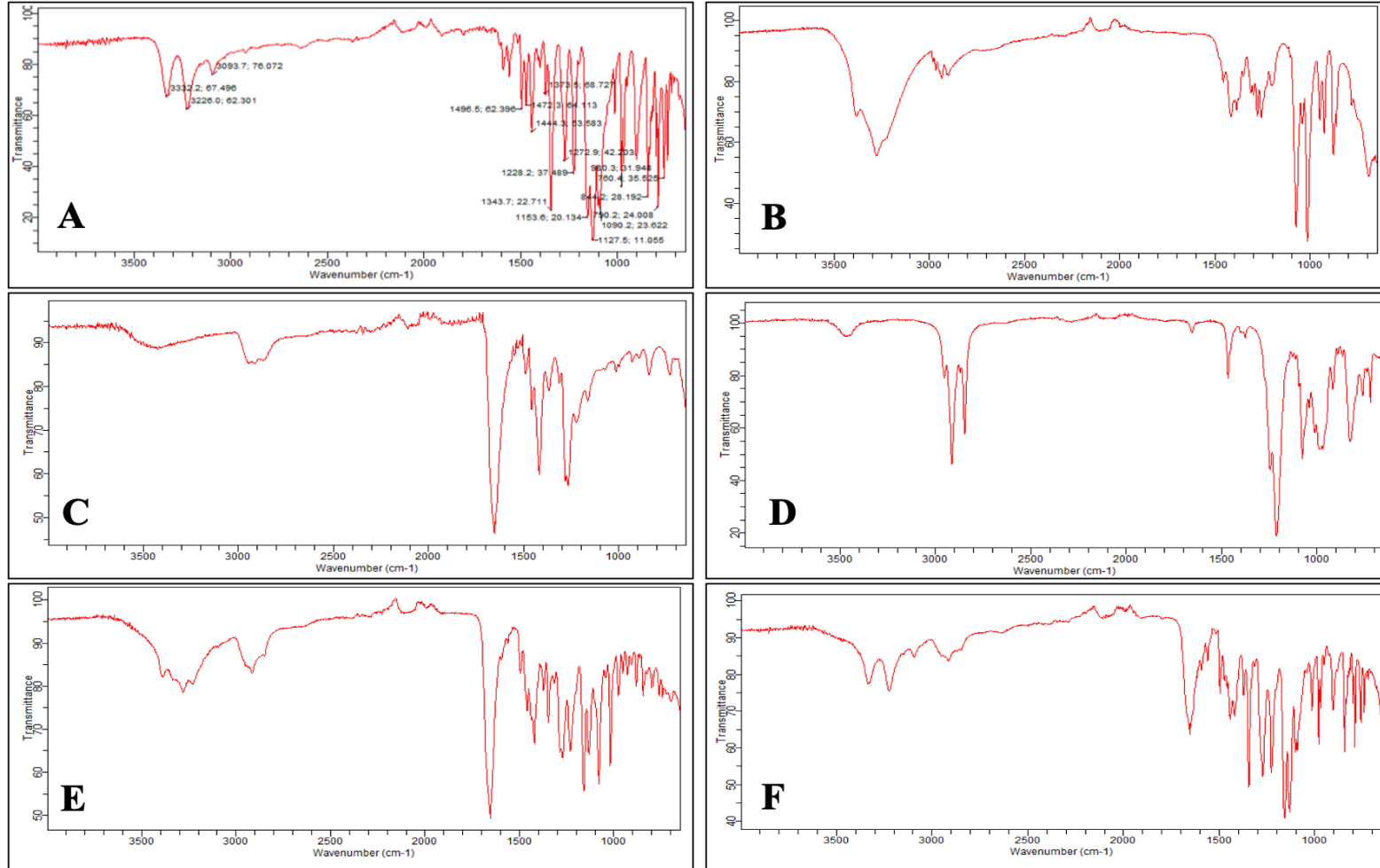




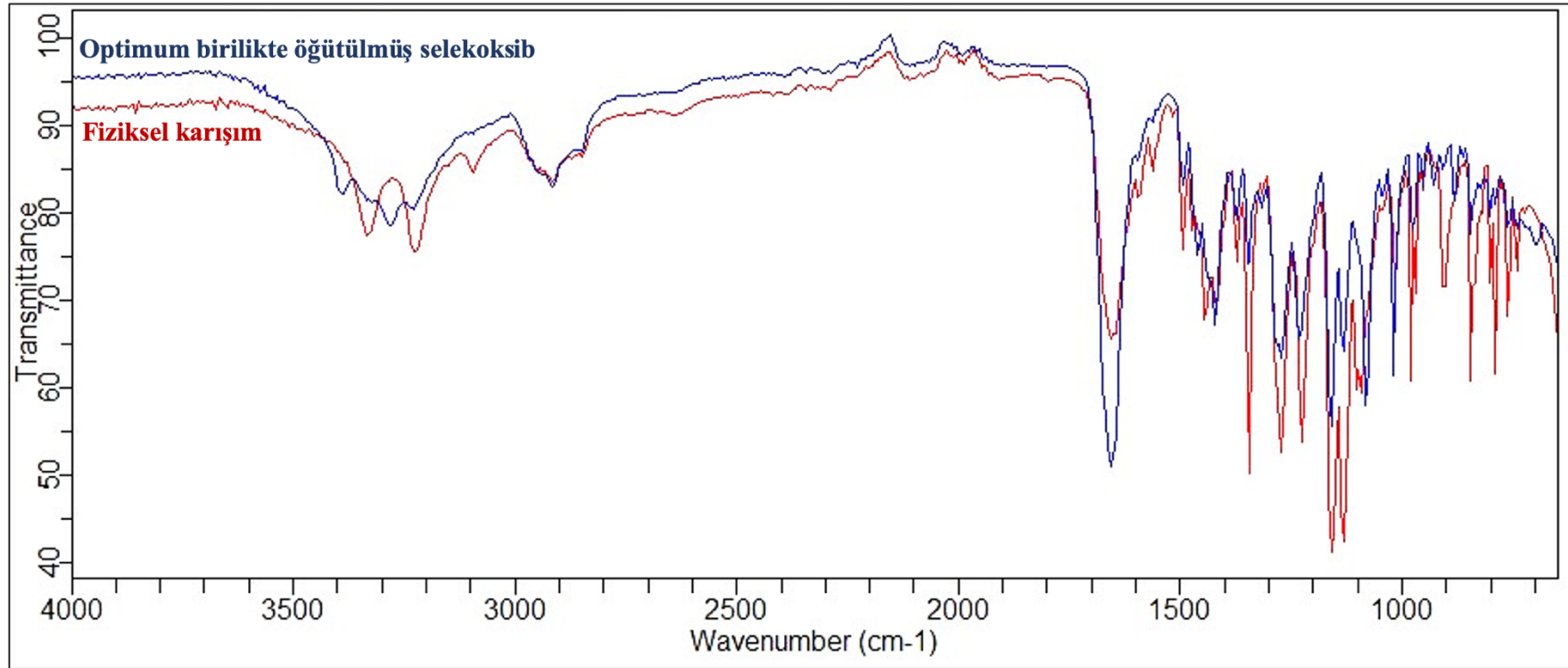
Şekil 4.31. Farklı sıcaklık artışlarında optimum birlikte öğütülmüş selekoksib ve fiziksel karışıma ilişkin termogramlar.

#### **4.8.4. Fourier Dönüümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)**

Öğütme bileşimindeki selekoksib, mannitol, polivinilpirolidon ve sodyum lauril sülfat maddelerine ilişkin FTIR spektrumları Şekil 4.32.'de, optimum birlikte öğütölmüş selekoksib bileşimi ve bu bileşime ilişkin fiziksel karışımın karşılaştırmalı FTIR spektrumları Şekil 4.33.'te verilmiştir.



**Şekil 4.32.** FTIR spektrumları: a) selekoksib b) mannitol, c) polivinilpirolidon, d) sodyum lauril sülfat, e) optimum birlikte öğütülmüş selekoksib bileşimi ve f) optimum bileşime ilişkin fiziksel karışım.

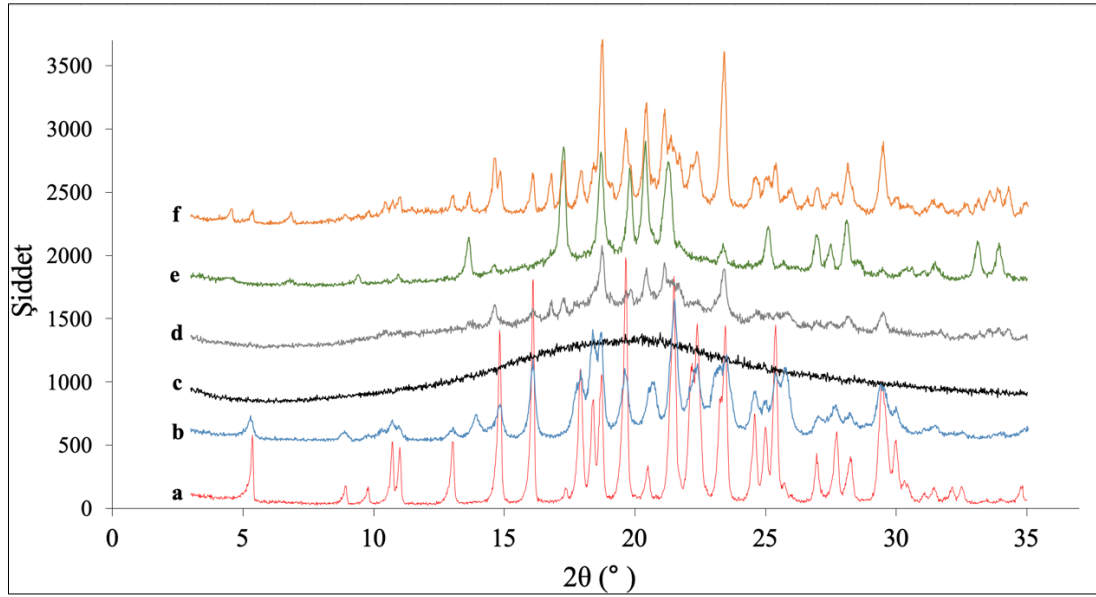


Şekil 4.33. Optimum birlikte öğütölmüş selekoksib ve fiziksel karışım ile ilişkin karşılaştırmalı FTIR spektrumları.

#### 4.8.5. X-Işını Difraksiyonu (XRD)

Analizi yapılan tüm örneklere ilişkin X-ışını difraktogramları Şekil 4.34.'te verilmiştir.

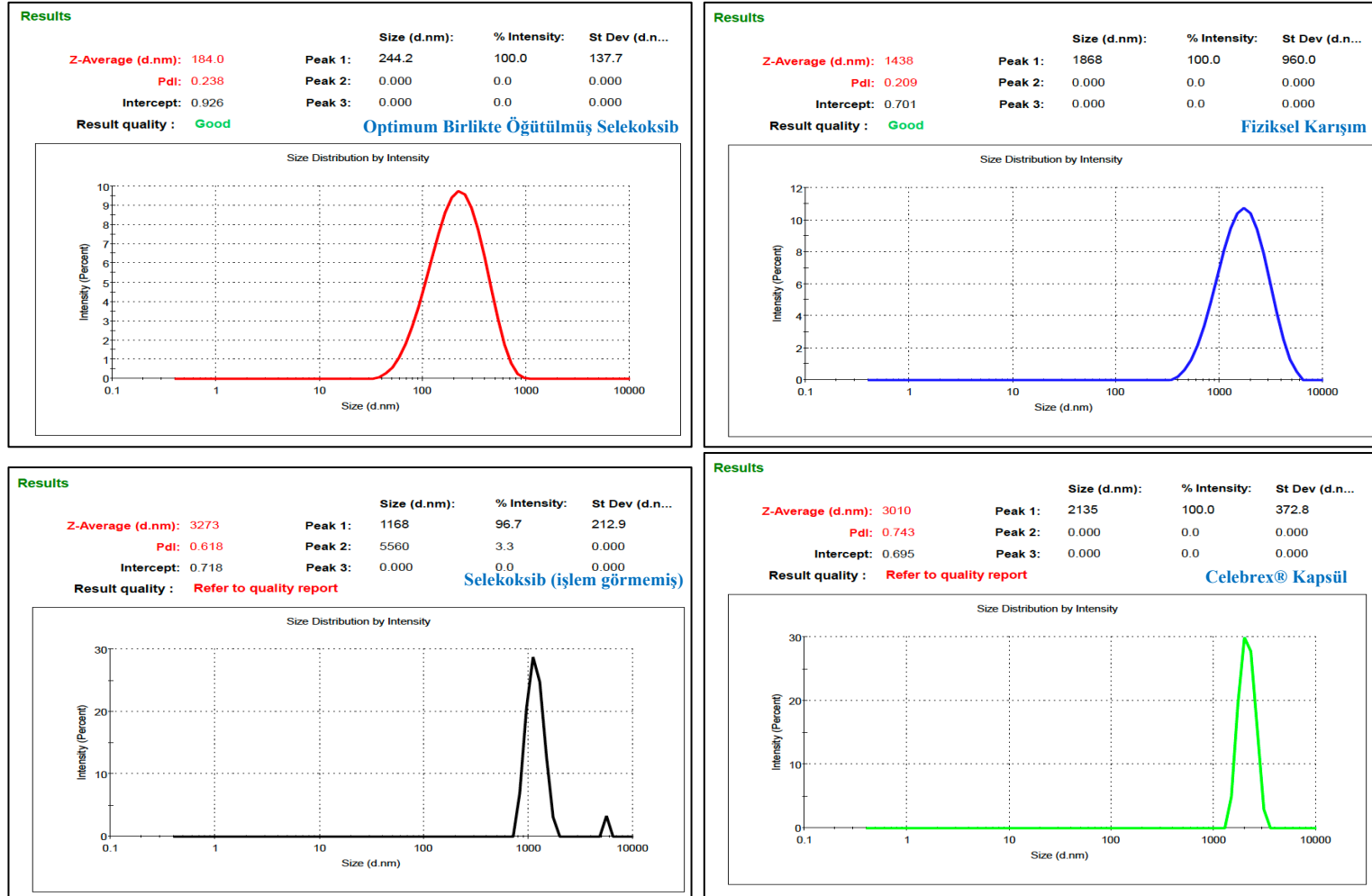
Tüm deneylerde polimorfik yapısı kristal Form-III olan selekoksib etkin maddesi kullanılmıştır. Kristal selekoksibin X-ışını difraktometresinde verdiği karakteristik keskin pikler 16,0; 19,6; 21,5; 22,3; 23,4; 25,3 ve  $29,4^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$   $2\theta$  değerlerinde iken; kristal Form-III için karakteristik keskin pikler 5,3; 10,7; 11,0; 13,0; 14,8; 16,1; 17,9; 18,4; 18,7; 19,6; 21,5; 22,1; 22,4; 23,4; 25,3 ve  $29,5^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$   $2\theta$  değerlerinde gözlenmektedir. Şekil 4.34. (a) ile gösterilen difraktogram işlem görmemiş kristal Form-III yapısındaki selekoksibe ilişkindir. Şekil 4.34. (b) ile gösterilen difraktogram ise selekoksib etkin maddesinin tek başına 4 saat boyunca 500 devir/dk öğütme hızında kuru öğütme işlemine maruz bırakılmış örneğine ilişkindir. Şekilden de görüldüğü üzere selekoksibin hem kristal hem de kristal Form-III yapısına karakteristik olan pikler korunmaktadır ve sadece öğütme sonucu partikül büyüklüğünün küçülmesine nedeniyle pik şiddetinde azalma meydana gelmiştir. Şekil 4.34. (c) ile gösterilen difraktogram, birlikte öğütülmüş selekoksib:PVP (1:1) bileşimine ilişkindir. Selekoksibin PVP ile birlikte öğütülmesi sonucunda kristal form tamamen amorf şekle dönüşmüştür. Bununla birlikte Şekil 4.34. (d) ve Şekil 4.34. (e) ile gösterilen difraktogramlarda öğütme bileşimine manitolün eklenmesi sonucu kristal şekilden tamamen amorf şekle dönüşüm engellenebilmiştir. Ek olarak her iki formülasyonun da partikül büyüklüğünün 1000 nm'den küçük olması nedeniyle piklerin şiddeti azalmıştır.



**Şekil 4.34.** X-ışını difraktogramları: a) selekoksib b) tek başına öğütülmüş selekoksib (F01), c) birlikte öğütülmüş selekoksib ve polivinilpirolidon (F03), d) optimum birlikte öğütülmüş selekoksib bileşimi (polivinilpirolidon>mannitol), e) birlikte öğütülmüş selekoksib, polivinilpirolidon, mannitol ve sodyum lauril sülfat (PB06) (polivinilpirolidon<mannitol) ve f) fiziksel karışım.

#### 4.8.6. Partikül Büyüklüğü

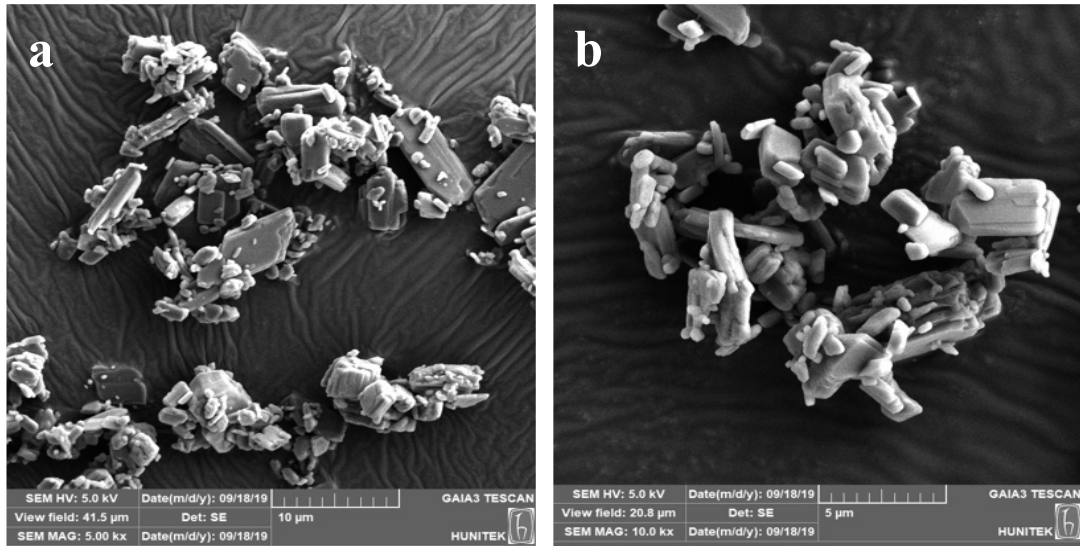
Ön tarama deneyleri kapsamında hazırlanan formülasyonların partikül büyüklüğü 350-1120 nm aralığında bulunmuştur. Plackett-Burman deney tasarımı kapsamında hazırlanan formülasyonların partikül büyüklüğü ise 350-1100 nm aralığında bulunmuştur. Merkezi kompozit ve Bayes optimizasyonu deney tasarımlarında hazırlanan formülasyonlar için partikül büyüklüğü yanıt değişken olarak değerlendirilmediğinden bu formülasyonlar için partikül büyüklüğü ölçümü yapılmamıştır. Ancak optimum formülasyon, bu formülasyona ilişkin fiziksel karışım ve referans ürün için yapılan partikül büyüklüğü ölçüm grafikleri Şekil 4.35.'te verilmiştir. İşlem görmemiş selekoksib etkin maddesinin partikül büyüklüğü dağılım grafiği Şekil 4.6.'da verilmiştir, ancak optimum birlikte öğütülmüş selekoksib ile karşılaştırılabilmesi için dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemi ile de ölçüm yapılmıştır.



Şekil 4.35. Selekoksib, optimum birlikte öğütülmüş selekoksib, fiziksel karışım ve Celebrex® Kapsül'e ilişkin partikül büyüklüğü ölçüm grafikleri.

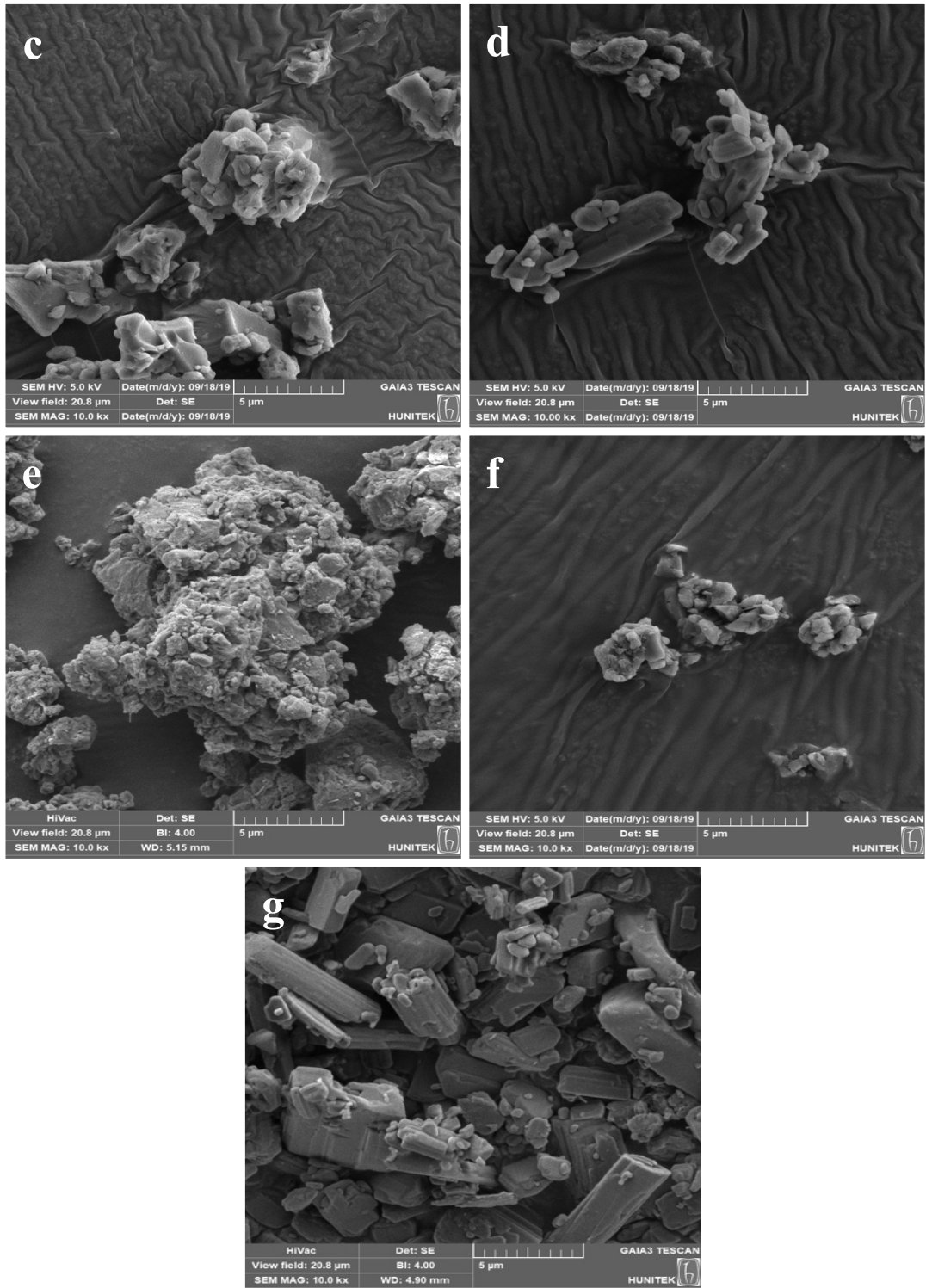
#### 4.8.7. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

İşlem görmemiş selekoksib, polivinilpirolidon, sodyum lauril sülfat ve mannitol ile birlikte öğütülmüş selekoksibin SEM mikrografları Şekil 4.36.'da gösterilmiştir. İşlem görmemiş selekoksib kristal yapıdadır ve ortalama partikül büyüklüğü 1,4 -7,0  $\mu\text{m}$  aralığında ölçülmüştür (Şekil 4.36. (a) ve (b)). Birlikte öğütme bileşimine PVP ve SLS'nin eklenmesi, ortalama partikül büyüklüğünde önemli bir azalma sağlamıştır ve iki yardımcı madde, stabilizan görevi görerek partiküllerin agregasyonunu önlemiştir. Sonuç olarak, partiküllerin kristal yapısının azalmasına rağmen partiküller daha homojen morfolojiye sahip olmuştur (Şekil 4.36. (c)). Öğütme bileşimine PVP ve SLS'ye ek olarak mannitolün eklenmesi sonucunda partiküllerin kristal şeklinde meydana gelen değişim azalmıştır (Şekil 4.36. (e), (f)). Ancak öğütme bileşimindeki mannitol oranının PVP'den yüksek olması durumunda kristal formda meydana gelen değişiklik daha çok azalmıştır (Şekil 4.36. (d)). Öğütme bileşime ilişkin fiziksel karışımda ise selekoksib partikülleri daha büyük boyutta ve kristal şekildedir (Şekil 4.36. (g)).



Şekil 4.36. SEM görüntüleri: (a) ve (b) işlem görmemiş selekoksib.





**Şekil 4.36. (devam)** SEM görüntüleri: (c) birlikte öğütülmüş selekoksib ve polivinilpirolidon (F03), (d) birlikte öğütülmüş selekoksib, polivinilpirolidon, mannitol ve sodyum lauril sülfat (PB06) (polivinilpirolidon<mannitol), (e) ve (f) optimum birlikte öğütülmüş selekoksib bileşimi (polivinilpirolidon>mannitol), (g) fiziksel karışım.

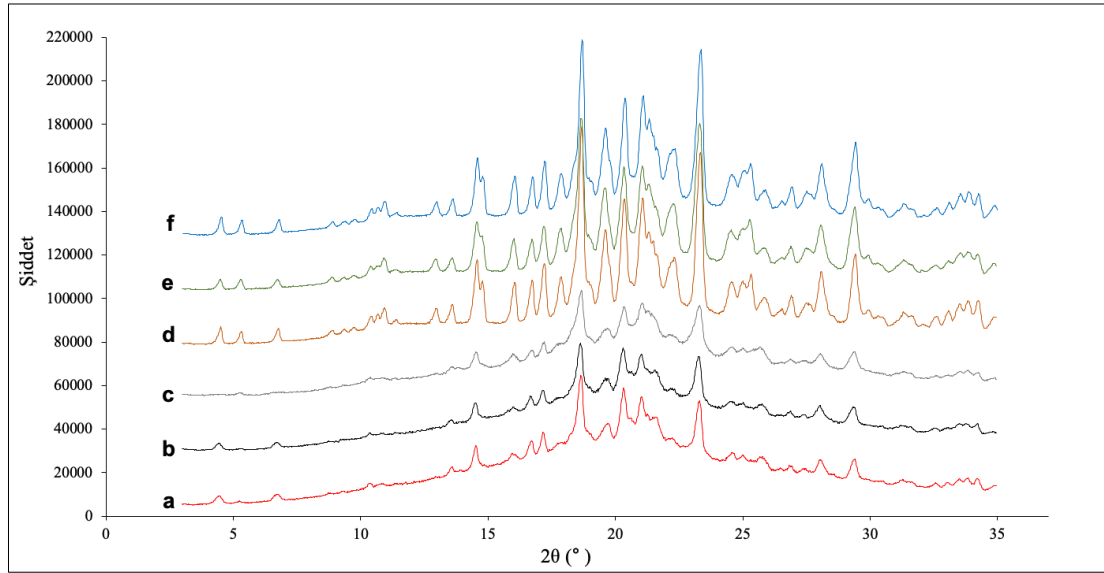
#### 4.8.8. Stabilite Çalışmaları

PVP, MAN ve SLS yardımcı maddeleri ile birlikte kuru öğütme yöntemi kullanılarak hazırlanan optimum birlikte öğütülmüş selekoksib bileşimlerinin fizikokimyasal stabilitesini araştırmak ve tespit etmek amacıyla hızlandırılmış koşul ( $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/\%75 \text{ BN} \pm \%5 \text{ BN}$ ) ve uzun dönem koşulunda ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/\%60 \text{ BN} \pm \%5 \text{ BN}$ ) 3 aylık stabilite çalışmaları yapılmıştır. Stabilite çalışmasına ilişkin analiz sonuçları Tablo 4.26.'da, X-ışını difraktogramları Şekil 4.37.'de verilmiştir. Optimum bileşimin partikül büyüklüğü başlangıç değerine göre artmıştır ancak tüm sonuçlar 300 nm'nin altında tespit edilmiştir. Polidispersite indeksi (PDI) değeri 3. ayın sonunda da 0,5'in altında bulunmuştur. Fiziksel karışımın ortalama partikül büyüklüğü ve PDI değerinin, her iki stabilite koşulundaki 3 aylık periyodun sonunda stabil olduğu bulunmuştur. Optimum bileşimin intrinsik çözünme hızında azalma tespit edilmiş, bu durum fiziksel karışımda da söz konusu olmuştur.

**Tablo 4.26.** Optimum birlikte öğütülmüş selekoksib ve fiziksel karışıma ilişkin 3 aylık stabilite analiz sonuçları.

Optimum birlikte öğütülmüş selekoksib	Zaman (ay)	Miktar Tayini (%)	Çözünmüş selekoksib (mg)	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	PDI
$40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/\%75 \text{ BN} \pm \%5 \text{ BN}$	0	100,5	92,2	184	0,24
	1	101	85,8		
	2	98,7	83,2		
	3	98,2	77,2	219	0,30
$25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/\%60 \text{ BN} \pm \%5 \text{ BN}$	3	99,8	84,0	217	0,33
Fiziksel Karışım	Zaman (ay)	Miktar Tayini (%)	Çözünmüş selekoksib (mg)	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	PDI
$40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/\%75 \text{ BN} \pm \%5 \text{ BN}$	0	103	22,6	1438	0,21
	1	101	22,0		
	2	99,5	17,2		
	3	99,8	13,8	1406	0,30
$25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/\%60 \text{ BN} \pm \%5 \text{ BN}$	3	102	24,8	1493	0,25

Stabilite koşullarında polimorfik yapı değişikliği X-ışını difraksiyonu ile değerlendirilmiştir. Şekil 4.37.'de verilen X-ışını difraktogramında stabilite süresince selekoksibin karakteristik piklerinde önemli bir fark olmadığını gösterilmiştir. Optimum birlikte öğütülmüş selekoksib ve fiziksel karışımın, her iki stabilite koşulunda da üç ayın sonunda stabil olduğu bulunmuştur.



**Şekil 4.37.** Optimum birlikte öğütülmüş selekoksibin X-Işını difraktogramları: (a) başlangıç (b), 40°C, %75 BN'de 3. ay, (c) 25°C, %60 BN'de 3. ay ve fiziksel karışımın X-Işını difraktogramları: (d) başlangıç. (e) 40°C, %75 BN'de 3. ay, (f) 25°C, %60 BN'de 3. ay.

#### 4.9. Mikronaltı/Nano Boyutta Selekoksib Bileşimleri ile Formülasyon Çalışmaları

Formülasyon çalışmalarına başlamadan önce piyasada yer alan Celebex® Kapsül referans ürününün kalite profili belirlenmiştir. Hedef ürünün; kalitatif bileşimi belirlenerek, görünüş, miktar tayini, ortalama ağırlık, % nem içeriği, çözünme değerleri gibi karakterizasyon testleri yapılmış ve oluşturulan hedef ürün profiline benzer bir formülasyon geliştirilmiştir. Referans ürünün kalitatif ve kantitatif bileşimi Tablo 4.27.'de, fizikokimyasal karakterizasyon çalışma sonuçları Tablo 4.28.'de verilmiştir.

**Tablo 4.27.** Celebrex® Kapsül kalitatif ve kantitatif bileşim.

<b>Maddeler</b>	<b>Miktar (mg/kapsül)</b>
Selekoksisib	200 mg
Laktoz Monohidrat	49,8 mg
Polivinilpirolidon K30	Bilinmemektedir.
Sodyum Lauril Sülfat	Bilinmemektedir.
Kroskarmelloz Sodyum	Bilinmemektedir.
Magnezyum Stearat	Bilinmemektedir.

**Tablo 4.28.** Celebrex® Kapsül karakterizasyon çalışma sonuçları.

<b>Test</b>	<b>Sonuç</b>
Görünüş	Beyaz-kırık beyaz renkte granüller içeren sert jelatin kapsül
Miktar Tayini	
Selekoksisib	%100,5
Kapsül İçi Toz Miktarı	280 mg
% Su İçeriği	%2,4
Çözünme Hızı (30. dk-pH 12+%0,5 SLS)	%83

Referans ürün karakterizasyonunun tamamlanmasının ardından referans ürün ile aynı dozaj şeklinde formülasyon geliştirilmesi hedeflenmiştir. Referans ürün bileşiminde yer alan laktoz monohidrat seyreltici-doldurucu fonksiyona sahiptir, polivinilpirolidon bağlayıcı olarak kullanılmaktadır. Kroskarmelloz sodyum dağıtıcı fonksiyonundadır ve sodyum lauril sülfat ıslatıcı ajan olarak kullanılmaktadır. Magnezyum stearat ise, selekoksisib granüllerinin kapsüllere kolay bir şekilde doldurulabilmesi için lubrikan (kaydırıcı) etki göstermesi için kullanılmaktadır.

Merkezi kompozit deney tasarımı ile belirlenen optimum birlikte öğütülmüş selekoksisib bileşimi, selekoksisib formülasyonunda etkin madde kaynağı olarak kullanılmıştır. Optimum birlikte öğütülmüş selekoksisib PVP:CXB, SLS:CXB ve MAN:CXB ağırlık oranları sırasıyla 1,5; 0,2; 0,5 şeklindedir.

Celebrex® Kapsül referans ürünü bir kapsülde 200 mg selekoksisib içerdiği için geliştirilen formülasyonda, 200 mg selekoksibe eşdeğer miktarda öğütme bileşimi kullanılmıştır. Ek olarak kapsüle doldurulan öğütülmüş tozun kapsülden hızlı bir şekilde dağılmasını sağlamak amacıyla dağıtıcı olarak kroskarmelloz sodyum

kullanılmıştır. Son olarak da doluma hazır tozun kapsüllere kolay bir şekilde doldurulabilmesi, paslanmaz çelik malzemeden yapılmış kapsül dolum makinesinde toz ve çelik yüzey arasındaki sürtünmeyi azaltmak, kayganlaştırmak için lubrikan olarak magnezyum stearat kullanılmıştır. Kroskarmelloz sodyum ve magnezyum stearatın kullanım oranına, literatürde yer alan bilgiler ve yapılan ön denemeler sonucunda karar verilmiştir. Geliştirilen formülasyona ilişkin kalitatif ve kantitatif bileşim Tablo 4.29.'da verilmiştir.

**Tablo 4.29.** Selekoksib 200 mg kapsül kalitatif ve kantitatif bileşim.

<b>Maddeler</b>	<b>Miktar (mg/kapsül)</b>
Selekoksib bileşimi (selekoksib, polivinilpirolidon, mannitol, sodyum lauril sülfat)	640 mg (200 mg selekoksibe eşdeğer)
Kroskarmelloz Sodyum	8,1 mg
Magnezyum Stearat	2,7 mg
<b>Toplam</b>	<b>650,8 mg</b>

#### 4.10. Selekoksib Formülasyonları Çözünme Çalışmaları

Çözünme çalışmalarında sink koşulun sağlandığı ve sağlanmadığı ortamlar oluşturulmuştur. Birlikte öğütme yöntemi ile hazırlanan optimum selekoksib bileşimlerinin ve Celebrex® Kapsül referans ürününün pH 1,2 +%0,2 SLS, pH 4,5 +%0,2 SLS, pH 6,8 +%0,2 SLS ortamlarındaki çözünürlük verilerine göre 1000 mL'lik çözünme ortamında sink koşulun sağlanabilmesi için test üründeki selekoksib miktarının 37 mg/kapsül olması, referans üründeki selekoksib miktarının ise 19 mg/kapsül olması gerektiği tespit edilmiştir. Aynı zamanda piyasada bulunan 200 mg yitiliğin çözünme profillerini inceleyebilmek için sink koşulun sağlanmadığı ve 1000 mL çözünme ortamındaki selekoksib miktarının 200 mg olduğu ürünler hazırlanarak çözünme testleri yapılmıştır. Selekoksibin sudaki çözünürlüğünün düşük olmasından dolayı FDA tarafından önerilen ve kalite kontrol testi olarak kullanılan çözünme testi, %1 oranında SLS içeren pH 12 çözünme ortamında yapılmaktadır. Ancak SLS'nin çözünme ortamına eklenmesi *in vivo* ortamı tam olarak taklit etmesini engellerken formülasyonlar arası çözünme hızı farkının saptanamamasına neden olabilir. Bu nedenle farklı SLS oranları ile çözünme çalışmaları yapılmıştır. Optimum

formülasyon ve Celebrex® Kapsül için pH 1,2 +%0,2 SLS, pH 4,5 +%0,2 SLS, pH 6,8 +%0,2 SLS çözünme ortamlarında sink koşulun sağlanarak yapılan *in vitro* çözünme deneylerine ilişkin sonuçlar Tablo 4.30.'da verilmiştir. Şekil 4.38. (A), (B) ve (C) grafiklerinde sunulan karşılaştırmalı çözünme hızı profillerinde optimum formülasyon için 37 mg selekoksib/1000 mL çözünme ortamı, referans ürün için 19 mg selekoksib/1000 mL çözünme ortamı konsantrasyonları ile sink koşul sağlanmıştır. Optimum formülasyonun % çözünen değeri pH 1,2 +%0,2 SLS, pH 4,5 +%0,2 SLS, pH 6,8 +%0,2 SLS çözünme ortamlarında 10.dakikada sırasıyla %84 ± 5,1; %92 ± 5,5; %95 ± 3,5 iken; Celebrex® Kapsül için % çözünen değerler sırasıyla; %47 ± 9; %48 ± 7,2; %56 ± 4,3'tür ( $p < 0.05$ , Mann-Whitney analizi). Her iki ürünün üç ortamda 60. dakikada %90'dan fazlası çözünmüştür ve ilk zaman noktalarında test ürünün çözünme hızı referansa oranla çok daha yüksektir.

İkinci çalışmada 200 mg selekoksib içeren kapsüllerin %0,2 ve %0,5 SLS içeren pH 1,2; pH 4,5 ve pH 6,8 çözünme ortamlarında çözünme değerleri karşılaştırılmıştır. pH 1,2 pH 4,5, pH 6,8 ve pH 12 çözünme ortamlarında farklı SLS oranları ile yapılan *in vitro* çözünme deneylerine ilişkin sonuçlar Tablo 4.31.'de verilmiştir. Şekil 4.38. (D), (E), (F) ve (G) grafiklerinde sunulan karşılaştırmalı çözünme hızı profillerinde; test ürünün, referans ürün Celebrex® Kapsül'den daha yüksek çözünme hızına sahip olduğu görülmüştür. Optimum formülasyon ve referans ürünün çözünme profillerinin benzerliğini göstermek için hesaplanan benzerlik faktörü ( $f_2$ ) değerleri Tablo 4.32.'de verilmiştir.

**Tablo 4.30.** Optimum formülasyon (37 mg selekoksib/1000 mL) ve Celebrex® Kapsül (19 mg selekoksib/1000 mL) sink koşulun sağlandığı çözünme testi sonuçları (% çözünen).

Çözünme Ortamı	Formülasyon	Örnekleme Zamanı (dk)				
		10	20	30	45	60
pH 1,2+%0,2 SLS	Optimum Formülasyon	84±5,1	92±3,7	95±3,2	95±3,1	95±1,8
	Celebrex® Kapsül	47±9,0	68±7,1	74±6,1	84±4,5	89±3,4
pH 4,5+%0,2 SLS	Optimum Formülasyon	92±5,8	97±2,6	98±3,5	100±2,1	100±1,2
	Celebrex® Kapsül	48±7,2	69±5,9	74±4,5	85±4,1	90±3,0
pH 6,8+%0,2 SLS	Optimum Formülasyon	95±3,5	100±2,3	100±1,4	100±1,8	100±1,5
	Celebrex® Kapsül	56±4,3	73±3,9	81±2,1	92±3,2	93±1,9

$n = 6$ , sonuçlar ortalama±standart sapmaları olarak sunulmuştur.

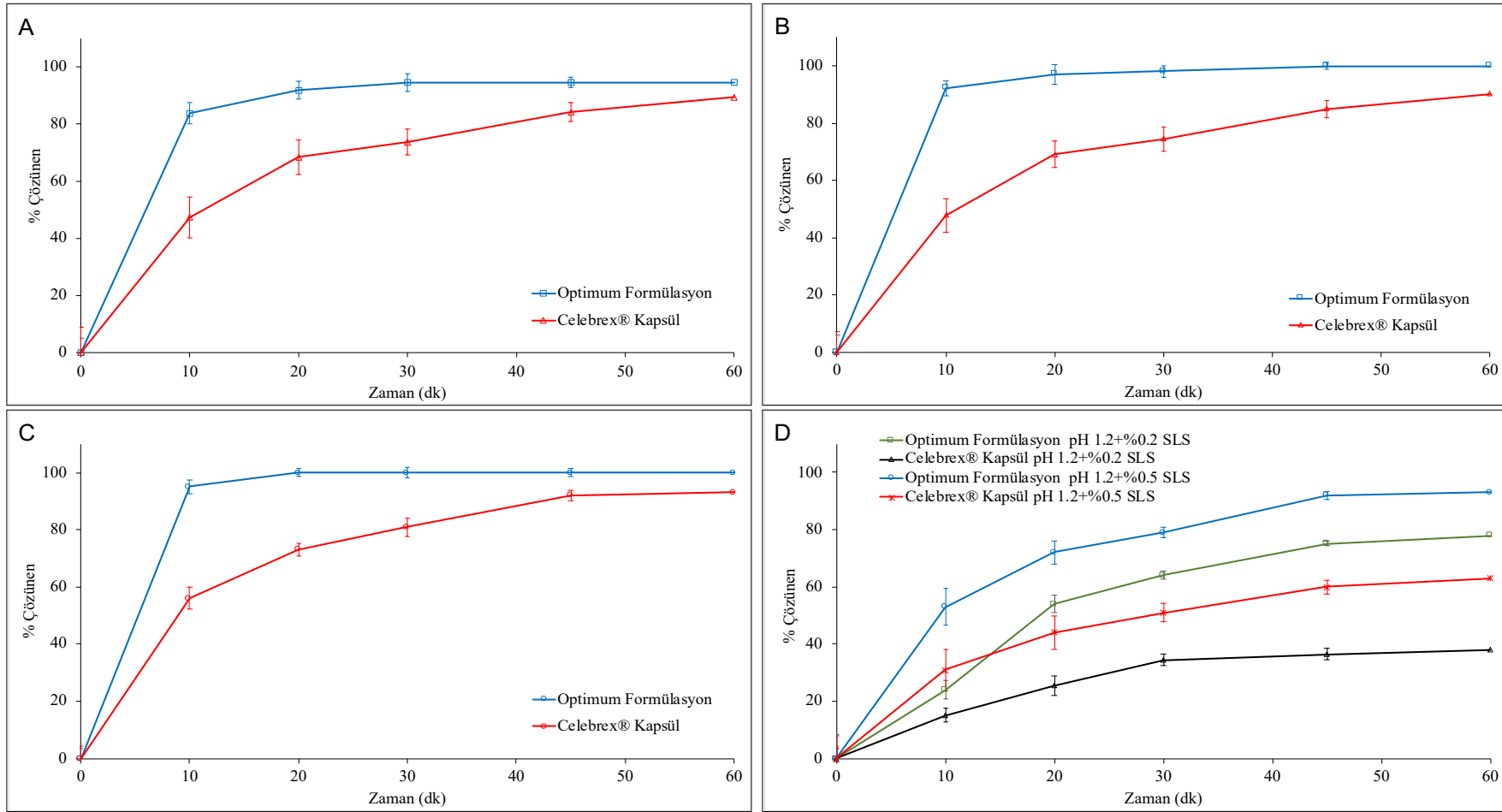
**Tablo 4.31.** Optimum formülasyon (200 mg selekoksib/1000 mL) ve Celebrex® Kapsül (200 mg selekoksib/1000 mL) sink koşulun sağlanmadığı çözünme testi sonuçları (% çözünen).

Çözünme Ortamı	Formülasyon	Örnekleme Zamanı (dk)				
		10	20	30	45	60
pH 1,2+%0,2 SLS	Optimum Formülasyon	24±4,3	54±3,3	64±2,9	75±1,4	78±0,8
	Celebrex® Kapsül	15±3,5	26±2,4	35±3,4	37±2,1	38±1,9
pH 4,5+%0,2 SLS	Optimum Formülasyon	22±5,9	44±4,4	63±4,8	68±3,3	74±2,9
	Celebrex® Kapsül	14±4,7	28±4,8	38±3,9	40±4,1	41±3,7
pH 6,8+%0,2 SLS	Optimum Formülasyon	23±3,8	48±3,2	73±2,5	79±1,9	83±2,1
	Celebrex® Kapsül	18±6,1	30±3,5	41±4,4	43±2,8	45±2,9
pH 1,2+%0,5 SLS	Optimum Formülasyon	53±8,2	72±6,4	79±4,2	92±1,7	93±1,5
	Celebrex® Kapsül	31±7,9	44±7,2	51±5,8	60±3,1	63±2,4
pH 4,5+%0,5 SLS	Optimum Formülasyon	53±4,3	73±2,9	80±3,5	93±1,6	94±1,3
	Celebrex® Kapsül	31±5,2	44±4,6	51±2,3	61±3,1	64±2,9
pH 6,8+%0,5 SLS	Optimum Formülasyon	63±4,2	85±1,4	93±3,1	95±1,2	97±1
	Celebrex® Kapsül	37±5,4	52±3,9	60±2,6	71±1,9	74±1,7
pH 12+%0,5 SLS	Optimum Formülasyon	76±2,6	88±2,1	94±1,6	98±1,4	100±0,6
	Celebrex® Kapsül	70±3,2	79±2,7	83±1,2	87±0,5	89±0,8

$n = 6$ , sonuçlar ortalama±standart sapmaları olarak sunulmuştur.

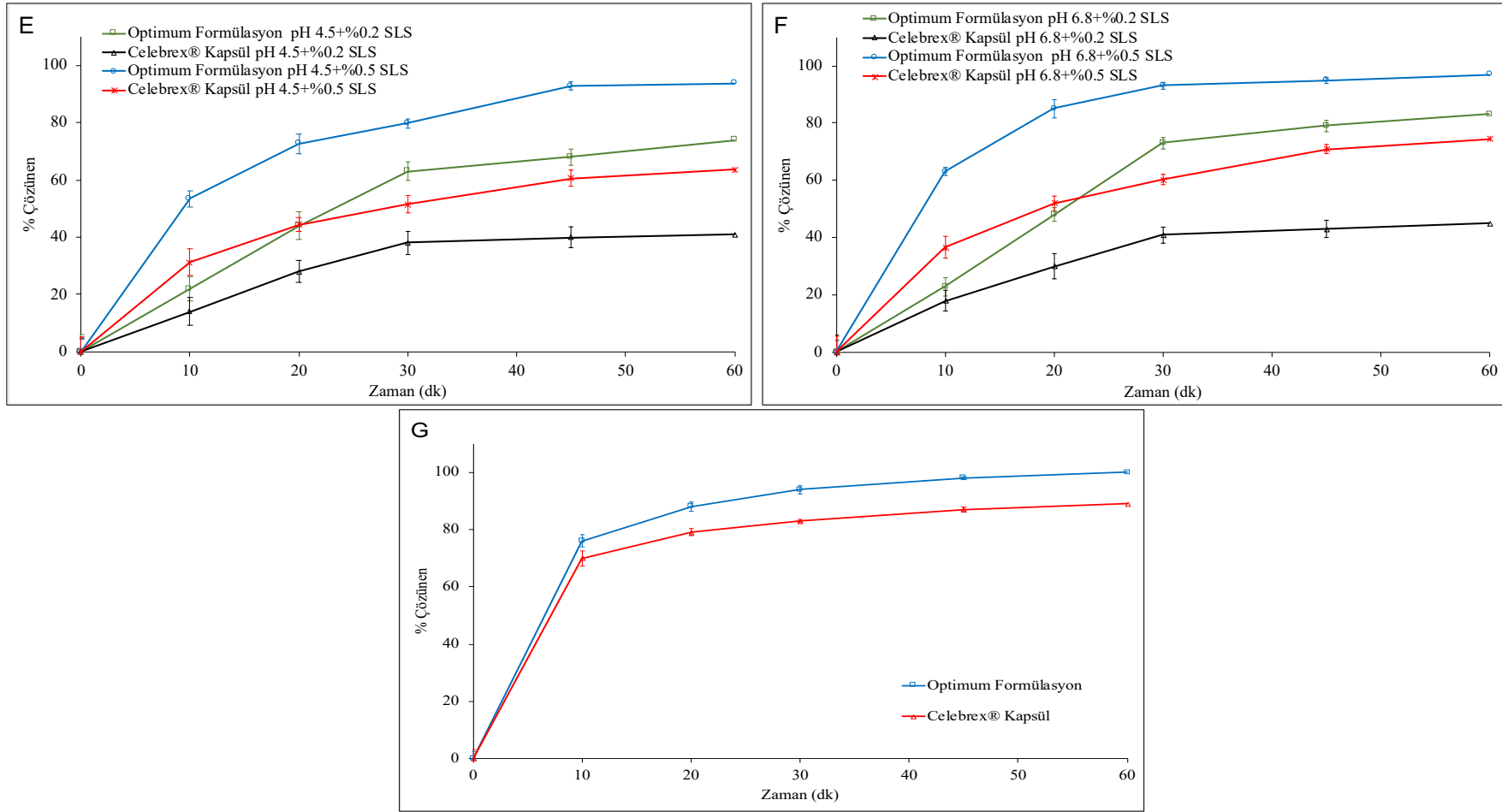
**Tablo 4.32.** Optimum formülasyon ve referans ürüne ilişkin benzerlik faktörü ( $f_2$ ) değerleri tablosu.

Çözünme Ortamı	Benzerlik Faktörü
pH 1,2+%0,2 SLS (sink koşul)	27.8
pH 4,5+%0,2 SLS (sink koşul)	23.9
pH 6,8+%0,2 SLS (sink koşul)	26.5
pH 1,2+%0,2 SLS (sink olmayan koşul)	25.3
pH 4,5+%0,2 SLS (sink olmayan koşul)	31.2
pH 6,8+%0,2 SLS (sink olmayan koşul)	27.1
pH 1,2+%0,5 SLS (sink olmayan koşul)	27.8
pH 4,5+%0,5 SLS (sink olmayan koşul)	27.6
pH 6,8+%0,5 SLS (sink olmayan koşul)	25.5
pH 12+%0,5 SLS (sink olmayan koşul)	52.4



**Şekil 4.38.** Optimum formülasyon ve Celebrex® Kapsül çözünme profilleri: sink koşul: A: pH 1,2±%0,2; B: pH 4,5±%0,2; C: pH 6,8±%0,2; sink olmayan koşul: D: pH 1,2±%0,2 ( $n = 3$ , hata çubukları standart sapmaları göstermektedir).





**Şekil 4.38. (devam)** Optimum formülasyon ve Celebrex® Kapsül çözünme profilleri: sink olmayan koşul: E: pH 4,5+%0,2 ve %0,5; F: pH 6,8+%0,2 ve %0,5; G: pH 12+%0,5 ( $n = 3$ , hata çubukları standart sapmaları göstermektedir).

#### 4.11. Selekoksisib Formülasyonlarına İlişkin Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmaları, optimum formülasyonun permeabilitesini tayin etmek amacıyla yapılmıştır. Ancak permeabilite çalışmalarında hücre canlılığı açısından uygun olabilecek etkin madde konsantrasyonunu belirleyebilmek için öncelikle sitotoksosite testi yapılmıştır.

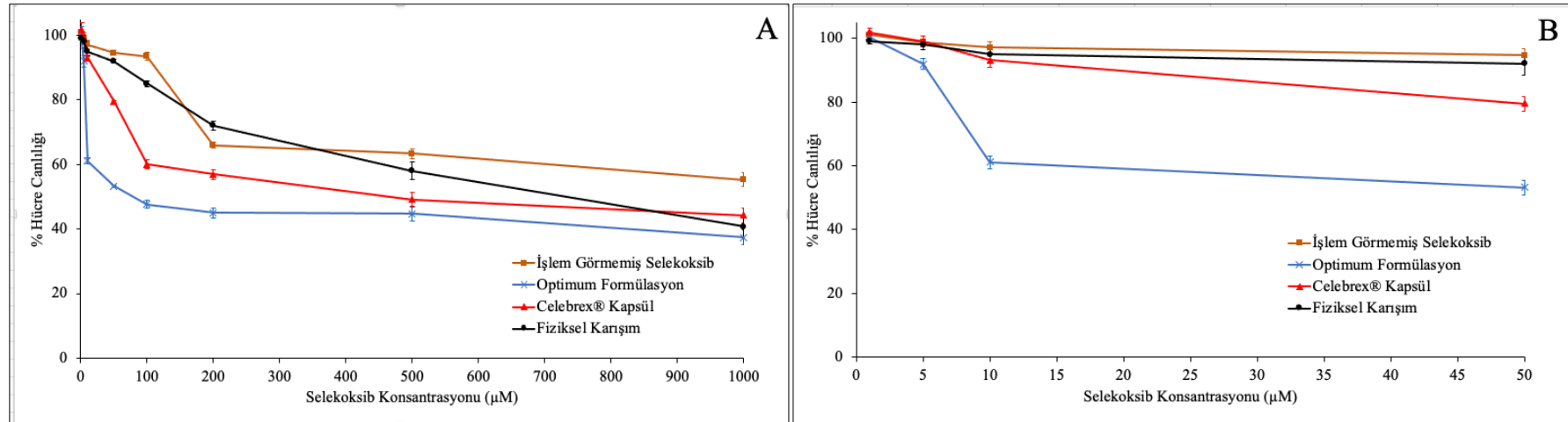
##### 4.11.1. Sitotoksosite Çalışmaları

İşlem görmemiş selekoksisib, fiziksel karışım, Celebrex® Kapsül ve optimum formülasyonun sitotoksitesisi, Caco-2 hücreleri kullanılarak, örneklerin farklı selekoksisib konsantrasyonlarında 4 saat inkübe edilmesi sonucunda belirlenmiştir. 1-1000 uM konsantrasyonda örneklerin % hücre canlılığı oranı Tablo 4.33.'de ve karşılaştırmalı canlılık grafiği Şekil 4.39.'da verilmiştir. Selekoksisib ve fiziksel karışım, 50 uM konsantrasyona kadar belirgin sitotoksik etki göstermemiş ve % hücre canlılığı %90'dan yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte, 50 uM selekoksisib konsantrasyonunun üzerinde, hücre canlılığı azalmaya başlamış ve 1000 uM'de yaklaşık %40'a düşmüştür. Optimum formülasyonun hücre canlılığı, selekoksisib konsantrasyonunun 1 uM'dan 50 uM'a yükseltilmesiyle %100'den %50'ye düşmüştür. Ancak, konsantrasyon 5 uM olduğunda hücre canlılığı oranı %90'dan daha yüksek bulunmuştur. Celebrex® Kapsül hücre canlılığı, selekoksisib konsantrasyonunun 1 uM'dan 50 uM'a yükseltilmesiyle %100'den %80'ine düşmüştür. Optimum formülasyondaki selekoksisibin yüksek çözünürlüğü nedeniyle, tüm numuneler için uygun hücre canlılığı değerini sağlayacak konsantrasyon seçilmiştir. Sonuç olarak, 5 µM konsantrasyonunda hücre canlılığının %90'dan yüksek olması nedeniyle final konsantrasyon olarak 5 µM belirlenmiştir.

**Tablo 4.33.** Selekoksib, optimum birlikte öğütülmüş selekoksib, fiziksel karışım ve Celebrex® Kapsül'e ilişkin sitotoksosite sonuçları.

Formülasyon	1000 $\mu\text{M}$	500 $\mu\text{M}$	200 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$
İşlem Görmemiş Selekoksib	55,3 $\pm$ 2,2	63,3 $\pm$ 1,6	66 $\pm$ 0,9	93,5 $\pm$ 1,1	94,6 $\pm$ 0,8	97,1 $\pm$ 1,3	98,8 $\pm$ 1,4	101,4 $\pm$ 2,8
Optimum Formülasyon	37,4 $\pm$ 1,1	44,6 $\pm$ 0,9	45 $\pm$ 0,6	47,7 $\pm$ 0,8	53,2 $\pm$ 1,1	61,1 $\pm$ 2,4	91,9 $\pm$ 2,1	100,3 $\pm$ 2,4
Fiziksel Karışım	40,7 $\pm$ 3,5	58 $\pm$ 2,7	72 $\pm$ 1,5	85 $\pm$ 0,9	92 $\pm$ 0,6	95 $\pm$ 1,6	98 $\pm$ 2,1	99 $\pm$ 0,4
Celebrex® Kapsül	44,3 $\pm$ 2,3	49,1 $\pm$ 2,1	56,9 $\pm$ 1,6	60 $\pm$ 1,3	79,5 $\pm$ 0,4	93,1 $\pm$ 0,9	99 $\pm$ 1,8	101,8 $\pm$ 2,3

$n = 3$ , sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapmaları olarak sunulmuştur.



**Şekil 4.39.** Sitotoksosite çalışması % hücre canlılığı karşılaştırmalı grafikleri; A: 1  $\mu\text{M}$ -1000  $\mu\text{M}$  aralığındaki konsantrasyonların % hücre canlılığı, B: 1  $\mu\text{M}$ -50  $\mu\text{M}$  aralığındaki konsantrasyonların % hücre canlılığı ( $n = 3$ , hata çubukları standart sapmaları göstermektedir).

#### 4.11.2. Permeabilite Çalışmaları

Örneklerin sitotoksitesinin belirlenmesi ve uygun hücre canlılığının sağlanması için optimum konsantrasyonun seçilmesinden sonra geçirgenlik çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmada, TEER ölçümlerinin sonuçları ( $>400 \text{ ohm} \times \text{cm}^2$ ) hücre tek katmanlarının sağlam olduğunu ve hiçbir hücrel hasar oluşmadığını göstermiştir. Formülasyonların suda disperse edilmesi ile hazırlanan süspansiyon örnekleri hücrelerin apikal tarafına uygulanmış ve 2 saat sonra bazolateral taraftan (1,5 mL) izole edilmiş örneklerdeki selekoksib miktarları Eşitlik 3.3.'te formül kullanılarak görünen geçirgenlik katsayıları ( $P_{app}$ ) hesaplanmıştır. Selekoksibin görünen geçirgenlik katsayısı  $0,52 \pm 0,15 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$  iken, optimum formülasyon, Celebrex® Kapsül ve fiziksel karışımın görünen geçirgenlik katsayıları sırasıyla  $12,40 \pm 3,12 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ ,  $9,36 \pm 1,61 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$  ve  $3,32 \pm 0,69 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$  olarak bulunmuştur (Tablo 4.34.).

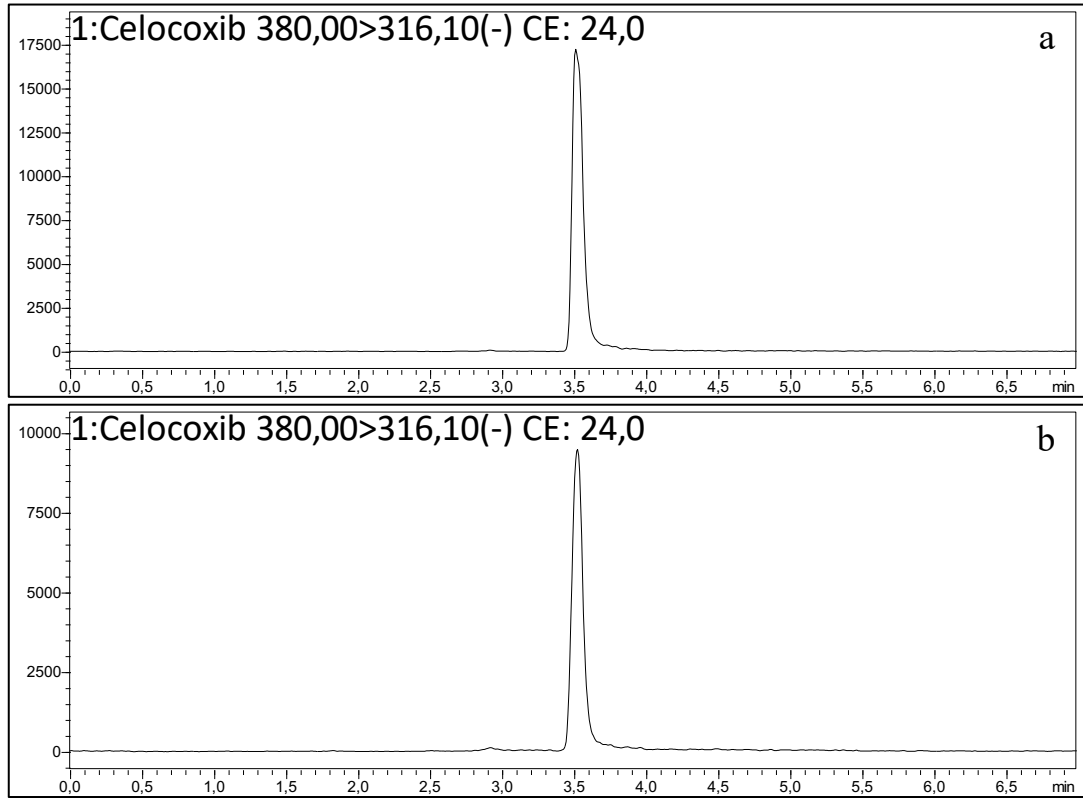
**Tablo 4.34.** Apikalden bazolaterale geçiş yönünde ortalama selekoksib  $P_{app}$  değerleri.

Formülasyon	$P_{app} \text{ (cm/s} \times 10^{-6}\text{)}$ Absorptif (Apikalden Bazolaterale)
İşlem Görmemiş Selekoksib	0,52±0,15
Optimum Formülasyon	12,40±3,12
Fiziksel Karışım	3,32±0,69
Celebrex® Kapsül	9,36±1,61

$n = 3$ , sonuçlar ortalama±standart sapmaları olarak sunulmuştur.

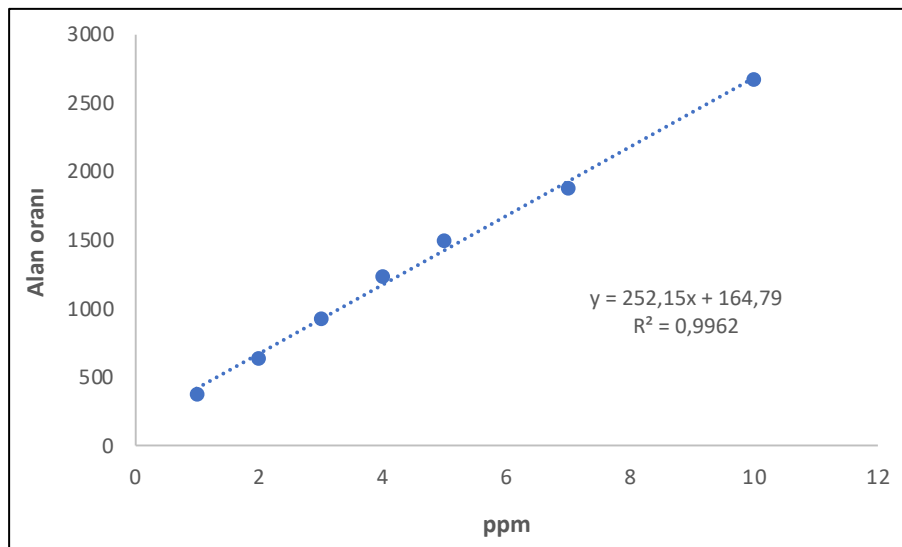
#### 4.12. Selekoksib Formülasyonlarına İlişkin Farmakokinetik Çalışmalar

Farmakokinetik çalışmalar bölüm 3.17.'de açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir. Oral uygulama öncesi (0), uygulama sonrası 0,5; 1; 2; 3; 4; 6; 12 ve 24. saatlerde kuyruk veninden alınan kan örnekleri selekoksib miktar tayini yapılmak üzere kullanılmıştır. Plazmadan selekoksib miktar tayini için oldukça seçici ve duyarlı bir analiz tekniği olan LC-MS/MS yöntemi kullanılmıştır. Bölüm 3.17.'de ayrıntılı bir şekilde açıklanan LC-MS/MS yöntemi ile yapılan selekoksib miktar tayinine ilişkin örnek kromatogramlar Şekil 4.40.'da verilmiştir.



Şekil 4.40. LC-MS/MS yöntemi ile yapılan selekoksib miktar tayinine ilişkin örnek kromatogram: a) standart çözelti, b) plazma.

Selekoksibin plazma konsantrasyonlarını saptamak için hazırlanan kalibrasyon eğrisi Şekil 4.41’de verilmiştir ve doğrusallık çalışması sonucunda LLOQ 0,1 µg/mL olarak saptanmıştır.



Şekil 4.41. Plazmadan selekoksib miktar tayini yöntemine ilişkin regresyon doğrusu. y pik alanını, x selekoksib konsantrasyonunu göstermektedir.

Her bir deney grubunda yer alan sıçanların plazma örneklerinden LC-MS/MS yöntemi ile tayin edilen bireysel plazma selekoksib konsantrasyonu verileri 10 mg/kg uygulama için Tablo 4.35., ve Tablo 4.36.'te; 40 mg/kg uygulama için Tablo 4.37. ve Tablo 4.38.'de verilmiştir. 10 mg/kg uygulama için zamana karşı plazma selekoksib konsantrasyonu grafikleri Şekil 4.42.'de; 40 mg/kg uygulama için zamana karşı plazma selekoksib konsantrasyonu grafikleri Şekil 4.43.'te verilmiştir.

**Tablo 4.35.** 10 mg/kg dozda uygulanan Celebrex® Kapsül ürünü için plazma selekoksib konsantrasyonları (n=5).

Zaman (saat)	R1*	R2	R3	R4	R5	Ortalama (µg/mL)	Standart Sapma
0,5	0,53	1,14	1,26	1,06	0,81	0,96	0,29
1	0,60	2,11	3,31	3,30	1,39	2,14	1,19
2	2,26	3,38	3,77	2,32	3,66	3,08	0,73
3	2,31	3,37	3,57	3,03	2,40	2,94	0,57
4	2,93	2,65	3,84	-	2,30	2,93	0,66
6	-	3,17	2,42	2,62	2,25	2,62	0,40
12	2,03	2,18	2,12	2,06	2,02	2,08	0,07
24	0,96	0,54	0,25	0,54	0,16	0,49	0,31

\*R; sıçanı 1; sıçan numarasını ifade etmektedir.

**Tablo 4.36.** 10 mg/kg dozda uygulanan optimum formülasyon için plazma selekoksib konsantrasyonları (n=5).

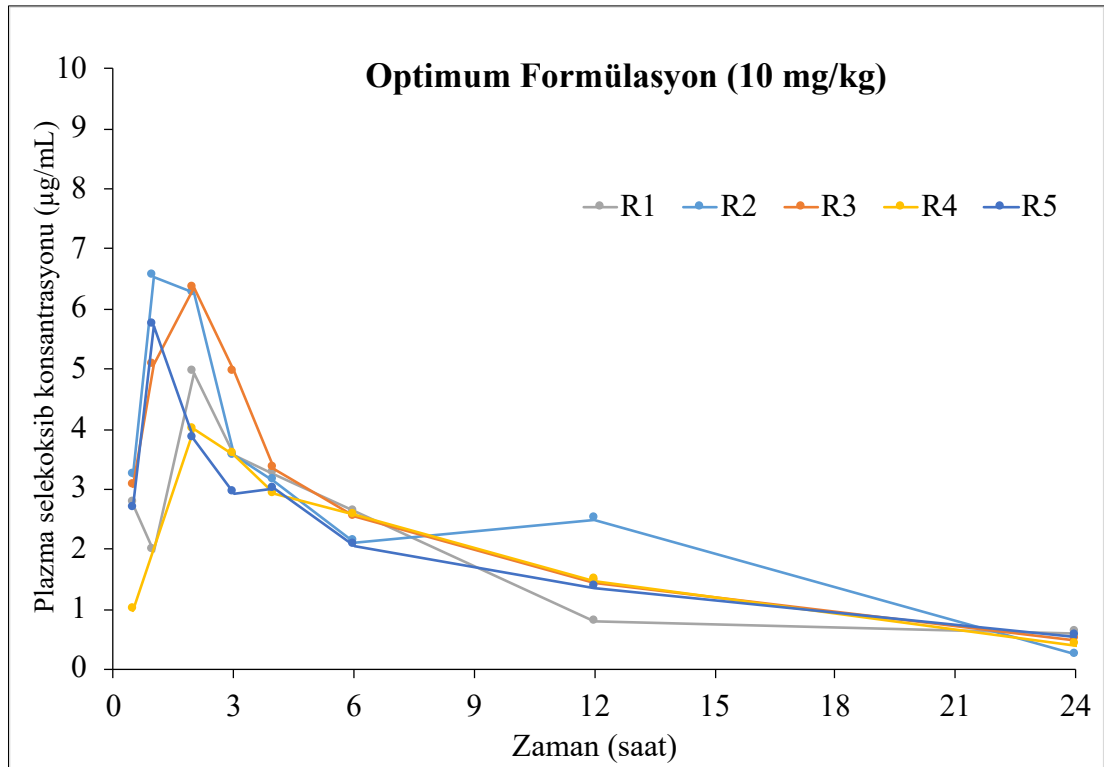
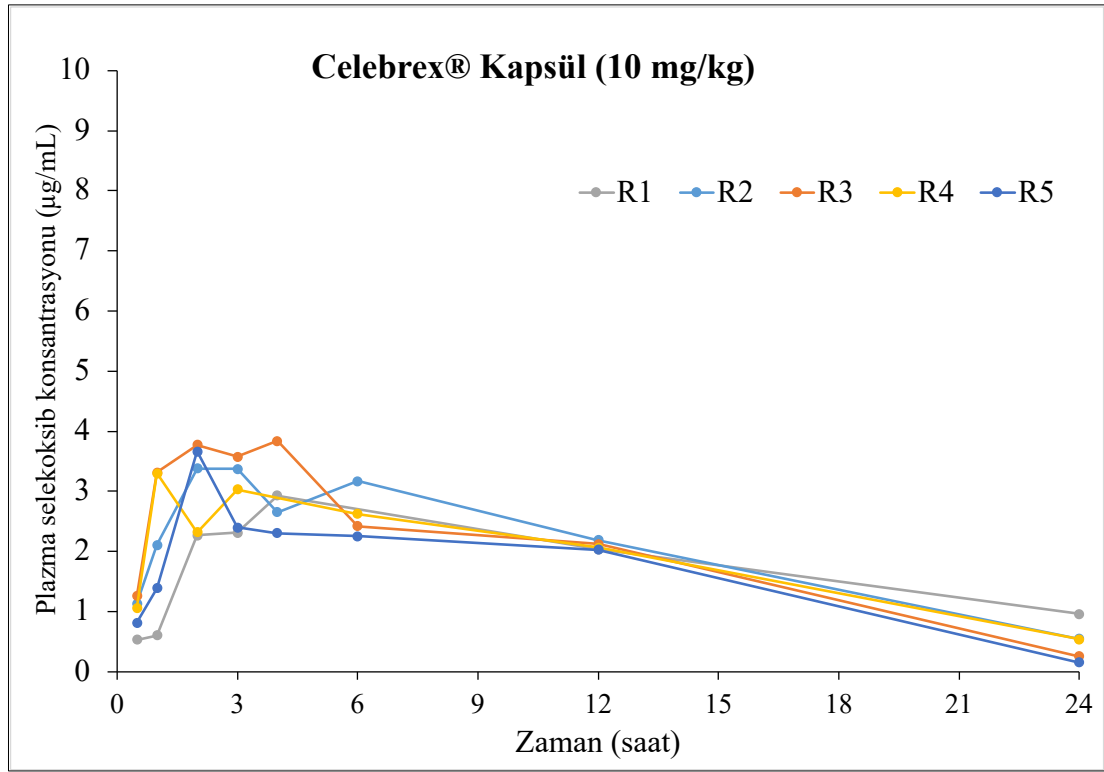
Zaman (saat)	R1	R2	R3	R4	R5	Ortalama (µg/mL)	Standart Sapma
0,5	2,75	3,22	3,05	0,98	2,69	2,54	0,90
1	1,97	6,54	5,07	-	5,72	4,83	2,00
2	4,93	6,26	6,35	3,99	3,83	5,07	1,20
3	3,56	3,55	4,95	3,57	2,93	3,71	0,74
4	3,25	3,14	3,34	2,91	3,01	3,13	0,17
6	2,62	2,12	2,54	2,57	2,06	2,38	0,27
12	0,79	2,50	1,45	1,48	1,36	1,52	0,62
24	0,61	0,24	0,48	0,40	0,55	0,46	0,14

**Tablo 4.37.** 40 mg/kg dozda uygulanan Celebrex® Kapsül ürünü için plazma selekoksib konsantrasyonları (n=5).

Zaman (saat)	R1	R2	R3	R4	R5	Ortalama (µg/mL)	Standart Sapma
0,5	4,06	1,20	2,98	2,79	3,16	2,84	1,04
1	4,00	1,60	3,03	3,35	4,03	3,20	0,99
2	3,46	2,07	3,06	2,88	-	2,87	0,58
3	4,16	4,77	3,40	3,83	5,64	4,36	0,87
4	3,79	-	4,51	4,44	-	4,25	0,40
6	3,45	3,79	5,29	4,74	4,90	4,43	0,78
12	4,97	-	3,45	4,29	3,50	4,05	0,72
24	1,43	1,25	2,04	1,31	1,49	1,50	0,32

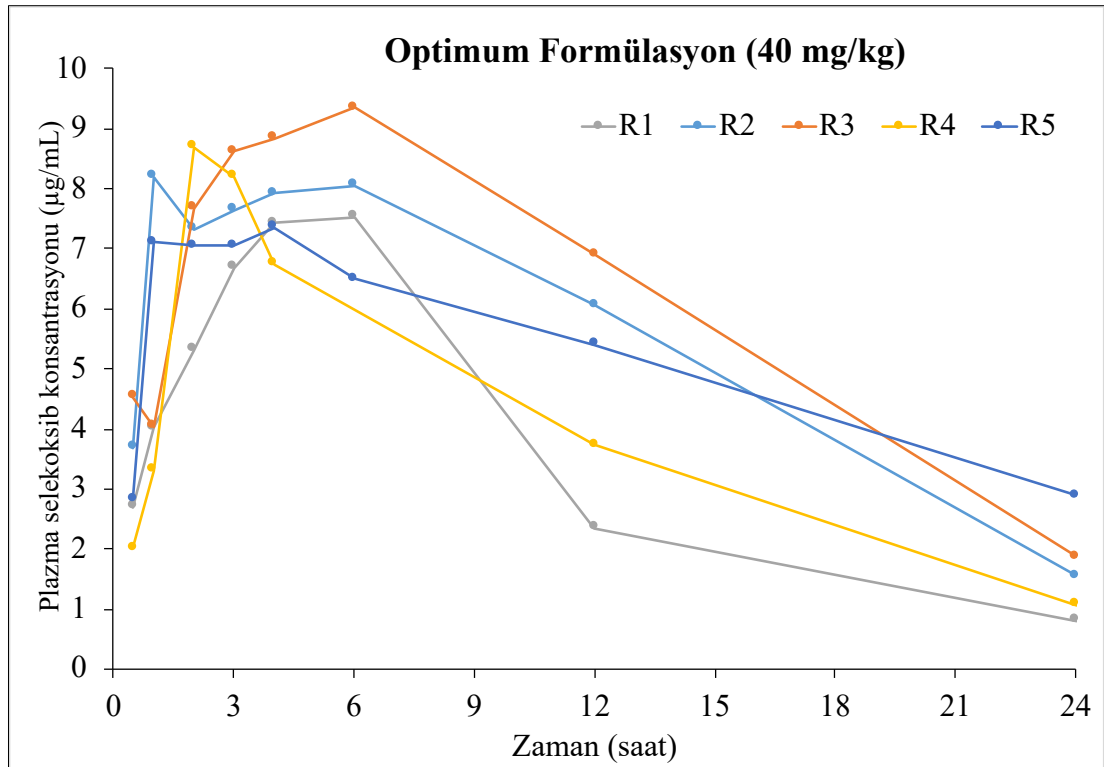
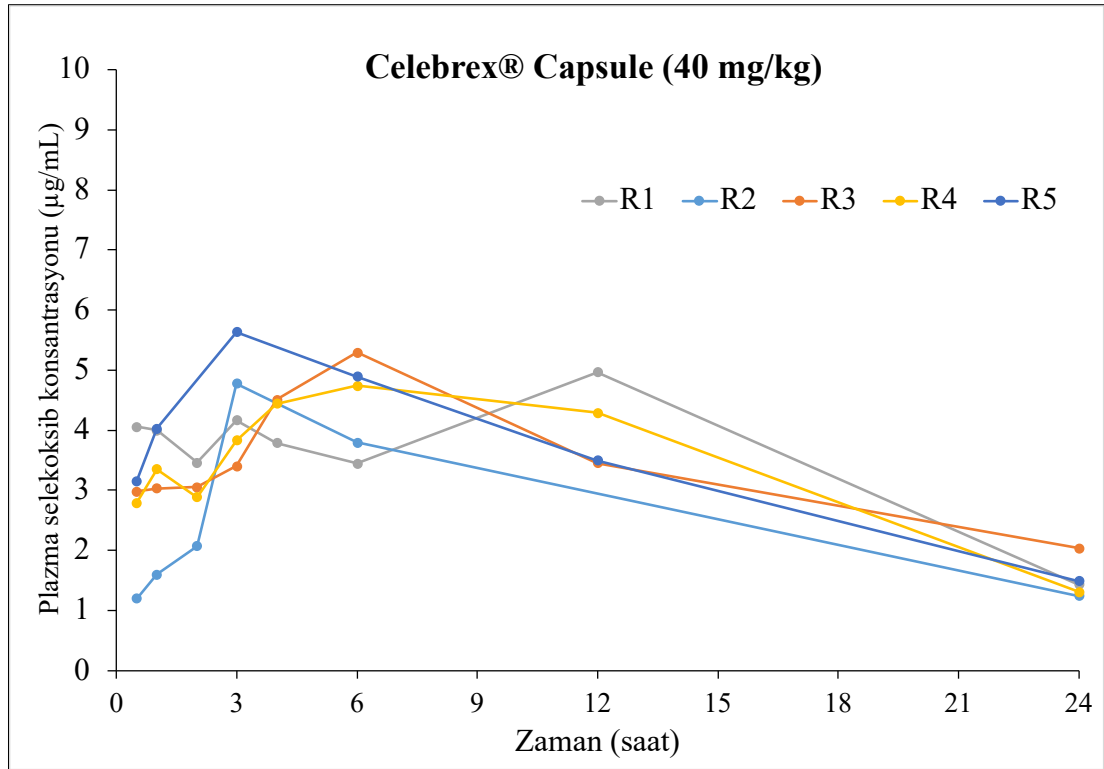
**Tablo 4.38.** 40 mg/kg dozda uygulanan optimum formülasyon için plazma selekoksib konsantrasyonları (n=5).

Zaman (saat)	R1	R2	R3	R4	R5	Ortalama (µg/mL)	Standart Sapma
0,5	2,70	3,69	4,53	2,01	2,83	3,15	0,97
1	4,03	8,20	4,04	3,31	7,10	5,34	2,17
2	5,32	7,32	7,68	8,70	7,05	7,21	1,23
3	6,68	7,65	8,61	8,20	7,05	7,64	0,80
4	7,42	7,93	8,84	6,74	7,36	7,66	0,78
6	7,54	8,06	9,34	-	6,49	7,86	1,19
12	2,36	6,06	6,90	3,73	5,40	4,89	1,83
24	0,80	1,55	1,87	1,07	2,89	1,64	0,81



**Şekil 4.42.** Oral yoldan 10 mg/kg uygulama sonrası her bir sıçan için zamana karşı plazma selekoksib konsantrasyonu grafikleri.





**Şekil 4.43.** Oral yoldan 40 mg/kg uygulama sonrası her bir sıçan için zamana karşı plazma selekoksib konsantrasyonu grafikleri.

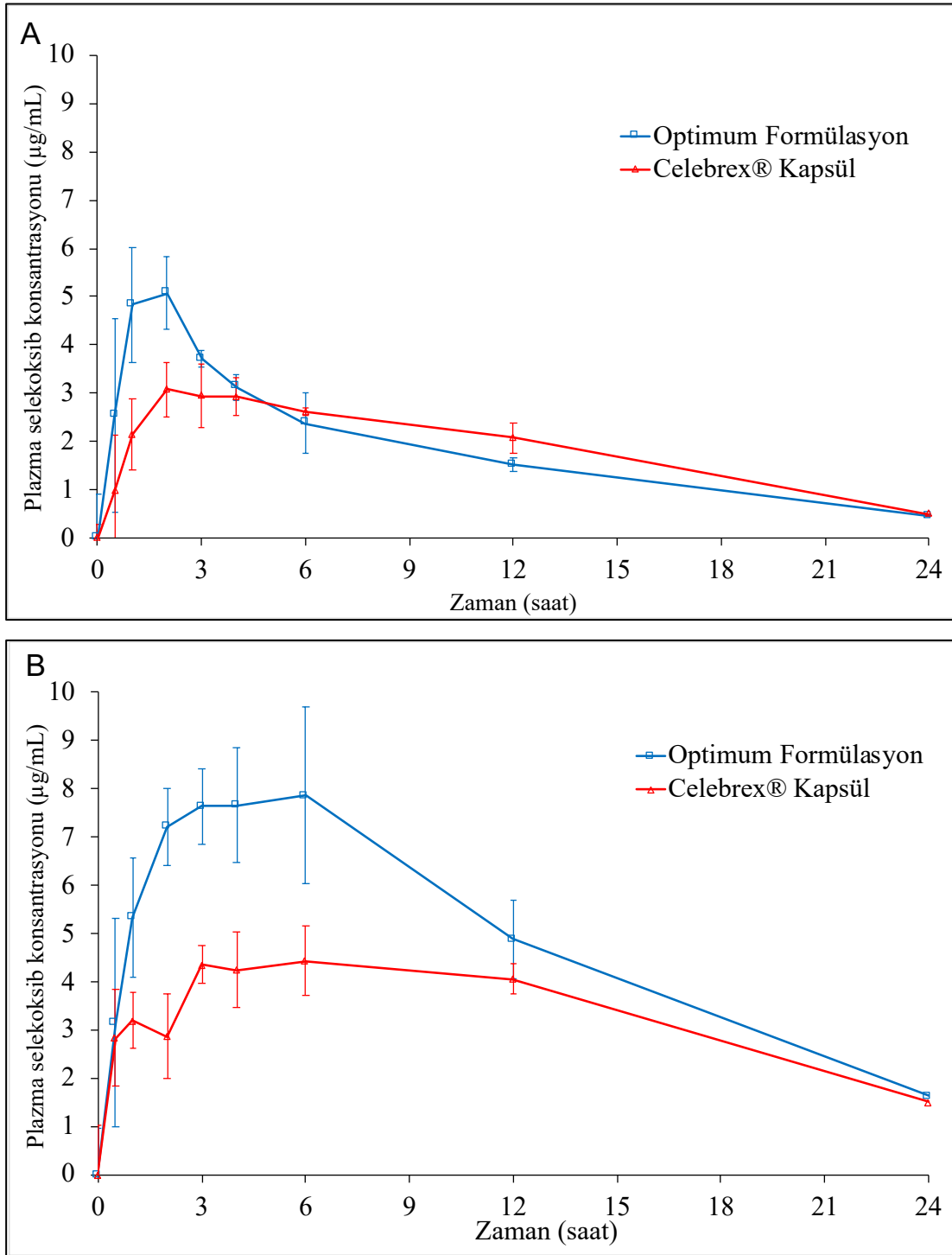
Her gruptaki sıçanların bireysel plazma selekoksib konsantrasyonları verileri kullanılarak Phoenix WinNonlin (Version 8.1, Certara L.P., ABD) yazılımı ile  $C_{maks}$ ,  $t_{maks}$ ,  $AUC_{0-24}$ ,  $AUC_{0-\infty}$ ,  $t_{1/2}$  ve ortalama kalış süresi (MRT) farmakokinetik parametreleri hesaplanmıştır. Farmakokinetik parametrelere ilişkin sonuçlar Tablo 4.39.'da verilmiştir.

**Tablo 4.39.** Oral uygulama sonrası optimum formülasyon ve Celebrex® Kapsül'e ilişkin farmakokinetik parametreler.

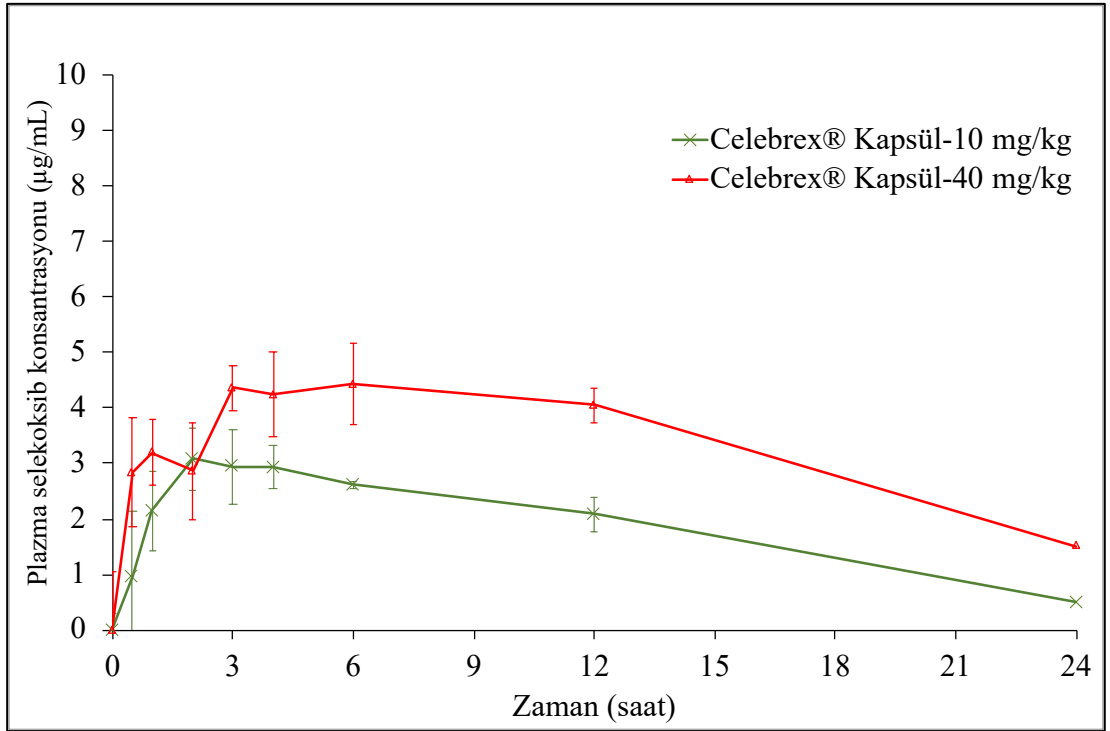
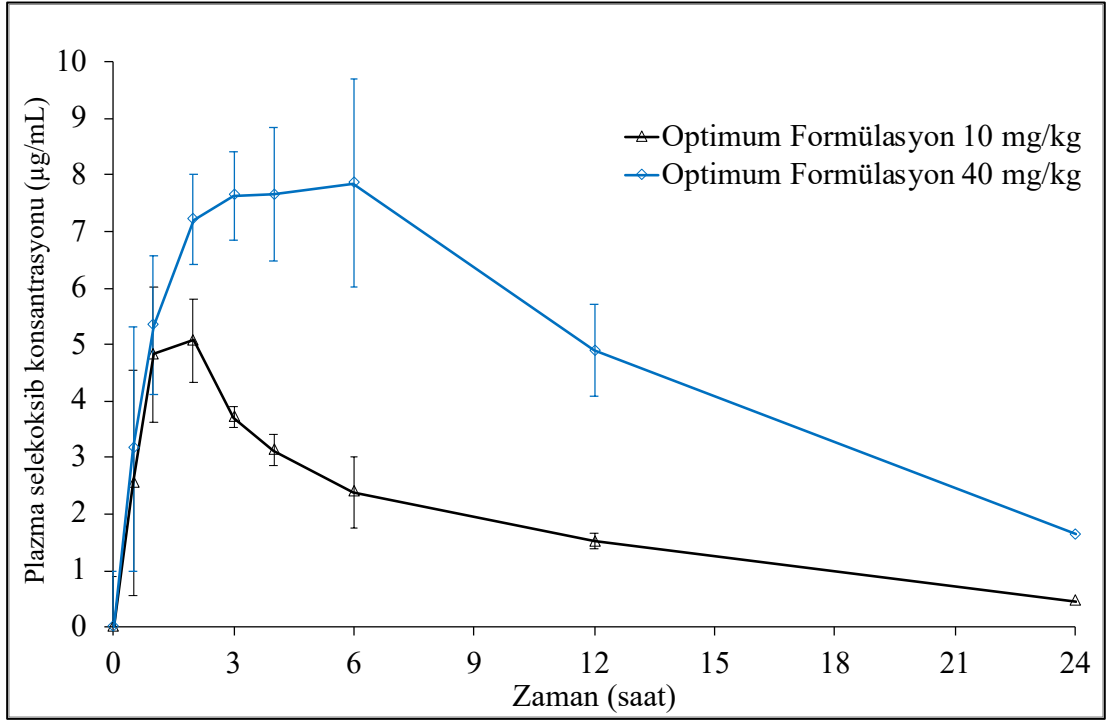
Farmakokinetik Parametreler	10 mg/kg		40 mg/kg	
	Optimum Formülasyon	Celebrex® Kapsül	Optimum Formülasyon	Celebrex® Kapsül
$C_{maks}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	5,51±1,06	3,42±0,35	8,23±0,82	5,08±0,38
$t_{maks}$ (h)	1,60±0,55	2,60±1,34	3,80±2,28	6,00±3,67
$AUC_{0-24}$ ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/mL}$ )	41,76±5,26	41,95±4,23	110,93±25,20	76,41±9,13
$AUC_{0-\infty}$ ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/mL}$ )	46,81±4,16	45,30±6,82	142,45±41,83	99,27±6,04
$t_{1/2}$ (h)	5,49±0,30	6,38±0,59	6,46±0,78	7,32±0,28
MRT (h)	7,93±0,39	9,21±0,98	9,33±0,89	10,44±0,42

$n = 5$ , sonuçlar ortalama±standart sapmaları olarak sunulmuştur.

Optimum formülasyon ve Celebrex® Kapsül'ün açlık koşullarında, 10 mg/kg ve 40 mg/kg dozlarında oral uygulama sonrası sıçanların zamana karşı ortalama plazma selekoksib konsantrasyonu grafiği çizilmiş, optimum formülasyonun her iki uygulama dozunda da maksimum plazma konsantrasyonunun referans üründen yüksek olduğu; 40 mg/kg dozunda ise eğri altında kalan alan değerinin referans üründen yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.44.). %90 güven aralığında, 10 mg/kg uygulama dozu için optimum formülasyonun bağıl biyoyararlanımı %100.4; 40 mg/kg uygulama dozu için optimum formülasyonun bağıl biyoyararlanımı %145.2 olarak bulunmuştur. Aynı zamanda optimum formülasyonun iki farklı uygulama dozunun farmakokinetik parametrelerinin karşılaştırabilmesi için zamana karşı plazma konsantrasyon grafikleri çizilmiş ve Şekil 4.45.'te verilmiştir. Benzer şekilde referans ürünün iki farklı uygulama dozuna ilişkin plazma konsantrasyon grafikleri Şekil 4.45.'te verilmiştir.



**Şekil 4.44.** Optimum formülasyon ve Celebrex® Kapsül karşılaştırmalı plazma konsantrasyonu-zaman grafikleri: A: 10 mg/kg, B: 40 mg/kg (hata çubukları standart sapmaları göstermektedir).



**Şekil 4.45.** 10 mg/kg ve 40 mg/kg dozlara ilişkin karşılaştırmalı plazma konsantrasyonu-zaman grafikleri (hata çubukları standart sapmaları göstermektedir).

## 5. TARTIŞMA

### 5.1. Selekoksibin Fizikokimyasal Karakterizasyon Çalışmaları

Selekoksib, suda çözünürlüğü düşük, farklı polimorfik yapılarda bulunan hidrofobik bir maddedir. Amorf formuna ek olarak Form I, II, III ve IV olmak üzere 4 farklı kristal formu mevcuttur. Ancak bu formlardan Form III, normal ortam koşullarında termodinamik olarak kararlı kristal formdur. Bu nedenle ilaç piyasasındaki selekoksib preparatlarında kristal Form III kullanılmaktadır (94, 152, 153, 155).

Tez çalışmalarımız kapsamında termodinamik olarak en stabil kristal form olan Form III tedarik edilmiş ve tüm deneysel çalışmalar bu etkin madde ile yapılmıştır. Kristal Form III selekoksib kullanılarak, birlikte kuru öğütme işlemi sonucunda; çözünürlüğü, çözünme hızı artırılmış selekoksib bileşimleri üretilmesi hedeflenmiştir. Araştırmamızda öncelikle tedarik edilen etkin maddenin, üretici tarafından belirtilmiş spesifikasyonları sağladığını doğrulamak amacıyla etkin madde analizleri yapılmıştır. Formülasyon çalışmalarına başlamadan önce etkin maddenin işlem görmemiş halinin fizikokimyasal özelliklerini saptamak amacıyla FTIR, miktar tayini, XRD, DSC ve PSD analizleri yapılmıştır.

Selekoksibin tez kapsamında yapılan FTIR analizlerine ilişkin sonuçların, etkin madde üreticisi tarafından verilen analiz sonuçları ve literatürde yer alan selekoksib FTIR spektrumları ile uyumlu olduğu görülmüştür (Bkz. Tablo 4.1., Şekil 4.1.). Selekoksib için en önemli karakteristik piklerden birisi hidrojen bağı yapma potansiyeli olan, 3332 ve 3226  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlenen -NH titreşim gerilimleridir (93, 105, 106, 110, 153).

Selekoksib etkin maddesinin EP, USP ve etkin madde üreticisi tarafından belirtilen valide edilmiş analitik yöntem kullanılarak miktar tayini analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar etkin madde üreticisinin analiz sonucu ile karşılaştırıldığında %100,1 (üretici) ve %100,2 (analiz sonucu) olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.2.). Deneysel sonuçların üretici ile benzer olması, etkin maddenin miktar tayini açısından uygun olduğunu göstermiştir.

Selekoksibin kristal formunun üreticinin belirttiği gibi Form III olduğunu tespit edilebilmek amacıyla X-ışını difraktometresi kullanılarak kristal şekil analizi yapılmıştır. Kristal selekoksib formunun karakteristik piklerine ek olarak kristal Form III için 5,3; 10,7; 11,0; 13,0; 14,8; 16,1; 17,9; 18,4; 18,7; 19,6; 21,5; 22,1; 22,4; 23,4; 25,3 ve  $29,5^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$   $2\theta$  değerlerinde keskin pikler gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.3.). Analizlerde gözlenen Form III'e ilişkin karakteristik piklerin etkin madde ana dosyasındaki bulgular ve literatürde belirtilen veriler ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir (93, 104-106, 110, 117, 152, 153, 155).

Selekoksibin fizikokimyasal özelliklerinden biri olan erime noktasının tayin edilmesi ve öğütme işlemleri sonucunda erime noktasında meydana gelebilecek değişikliklerin tespit edilebilmesi için DSC analizleri yapılmıştır. DSC termogramında (Bkz. Şekil 4.4.)  $162,24^{\circ}\text{C}$ 'de pik değere ulaşan selekoksib erimesine ilişkin endotermik bir pik gözlenmiştir. Bu termogramın, etkin madde ana dosyasında ve literatürde belirtilen veriler ile uyumlu olduğu belirlenmiştir (93, 110, 153).

Mikronizasyon, selekoksib etkin maddesinin üretim basamaklarından biridir (93). Üretilen etkin madde air jet değirmenler ile mikronize edildikten sonra analiz edilmekte ve ticari olarak piyasaya sunulmaktadır. Bu kapsamda, farklı etkin madde üreticileri mikron boyutta olmak üzere farklı PSD verileri sunabilmektedir. Tez kapsamında selekoksibin ortalama partikül büyüklüğünün mikronaltı/nano-boyuta küçültülmesi hedeflendiği için mikronize bir etkin madde tedarik edilmiştir. Tedarikçi firma tarafından selekoksib partikül büyüklüğü  $d_{90}$ :  $7,8\ \mu\text{m}$  olarak raporlanmış, yapılan PSD analizi sonucunda  $d_{10}$ :  $0,81\ \mu\text{m}$ ,  $d_{50}$ :  $3,45\ \mu\text{m}$  ve  $d_{90}$ :  $8,73\ \mu\text{m}$  olarak belirlenmiştir. Deneysel analiz bulguları, üretici firma bulguları ile uyumlu bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.5.) (93). Çalışmamızda öğütme deneyleri sonucunda elde edilen partikül büyüklüğü sonuçları, işlem görmemiş etkin maddenin partikül büyüklüğü ile karşılaştırılarak öğütme performansı değerlendirilmiştir.

## **5.2. Selekoksib Miktar Tayini Çalışmalarında Kullanılan Analitik Yöntemin Validasyonu**

Çözünürlük, intrinsik çözünme hızı, çözünme ve permeabilite çalışmalarından elde edilen örneklerdeki selekoksib miktarını tayin etmek için öncelikle literatürde yer alan analitik yöntemler incelenmiştir. Literatürde selekoksib miktar tayini için

spektrofotometrik, spektroflorometrik, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve elektrokimyasal yöntemler olmak üzere farklı analitik teknikler yer almaktadır (144, 151, 156, 157). Tez kapsamındaki *in vitro* çalışmalarda selekoksib konsantrasyonlarının hızlı, yüksek duyarlılık ve doğruluk ile, özgül bir şekilde tayin edilmesini sağlayacak HPLC yönteminin kullanılmasına karar verilmiştir. Literatürde yer alan valide analitik yöntemlerden hareketle bir analitik yöntem belirlenmiş (108, 144), miktar tayini analizleri Bölüm 3.6., Tablo 3.3.'te verilen kromatografik koşullar kullanılarak yapılmıştır. Belirlenen kromatografik koşullar ile gerçekleştirilecek çalışmaların sonuçlarının geçerli olduğunu kanıtlamak amacıyla ICH Q2/R1 “*Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*” rehberinde belirtilen validasyon parametreleri test edilerek validasyon çalışmaları yapılmıştır (145).

Kromatografik sistemin performansını değerlendirmek için yapılan sistem uygunluk çalışması ile; kuyruklanma faktörü ( $T < 2$ ), enjeksiyon tekrarlanabilirliği ( $RSD < \%1$ ), kapasite faktörü ( $k' > 2$ ), teorik plaka sayısı ( $N > 2000$ ) değerleri, ilgili rehberlerle uyumlu bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.3.) (158). Hazırlanan HPLC sisteminin uygun olduğu gösterildikten sonra diğer validasyon parametreleri çalışılmıştır.

Selekoksib öğütme bileşiminde ve formülasyonlarında yer alan maddelerin selekoksib ile girişim yapmadığı yapılan özgüllük çalışması ile gösterilmiştir (Bkz. Şekil 4.7.).

Tez kapsamındaki *in vitro* testlerde gözlenebilecek konsantrasyon değerlerini tespit edebilmek amacıyla geniş bir aralıkta (0,2 µg/mL-200 µg/mL) doğrusallık çalışması yapılmıştır. Her bir konsantrasyon için elde edilen pik alanları kullanılarak yapılan regresyon analizi sonucunda  $R^2$  değeri 0,9999 olarak bulunmuş (Bkz. Şekil 4.8.) ve 1'e çok yakın bir değer elde edilmesi analitik yöntemin doğrusal olduğunu göstermiştir (158).

Doğruluk çalışması sonucunda elde edilen % geri kazanım sonuçları %98-102 aralığında bulunmuş (Bkz. Tablo 4.5.) ve bu yöntem kullanılarak yapılacak analizlerde gerçek değere yakın sonuçlar elde edilebileceği gösterilmiştir.

Kesinlik çalışması kapsamında yapılan tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik çalışmalarına ilişkin %RSD değerleri %2'nin altında bulunmuş (Bkz. Tablo 4.6., Tablo 4.7., Tablo 4.8.) ve analiz sonuçlarının tekrarlanabilir olduğu gösterilmiştir (159, 160).

Analitik yöntemin teşhis ve tayin sınırları sırasıyla 0,4 µg/mL ve 1,4 µg/mL olarak bulunmuştur. Elde edilen bu değerlerin *in vitro* testlerde saptanan konsantrasyon değerlerinden düşük olması nedeniyle belirlenen yöntemin selekoksib miktar tayini için uygun olduğuna karar verilmiştir.

Hazırlanan selekoksib örneklerinin HPLC sistemindeki analizi süresince dayanıklı olması, tüm örneklerin analiz sonuçlarının doğru değerlendirilebilmesi için oldukça önemlidir. Yapılan stabilite çalışmaları ile selekoksib örneklerinin en az 48 saat boyunca dayanıklı olduğu gösterilmiştir (Bkz. Tablo 4.9.).

Selekoksisb örneklerinin HPLC sisteminde analiz edilmeden önce süzölebileceği filtre materyallerinin belirlenmesi için öncelikle literatür taraması yapılmıştır. Literatürdeki çalışmalarda adsorpsiyonun en az olduğu filtre materyalinin PTFE olduğu belirtilmiştir (146). Bu çalışma bulgusu dikkate alınarak hidrofilik PTFE filtre ile filtre çalışması yapılmıştır. Yapılan deneysel çalışmalara ilişkin bulgular literatür bulguları ile uyumlu bulunmuş; selekoksisb örneklerinin hidrofilik PTFE filtreden süzölmemesinin uygun olduğu gösterilmiştir (Bkz. Tablo 4.10.).

Yapılan validasyon çalışmaları sonununda selekoksisb miktar tayini için belirlenen analitik yöntemin özgüllük, doğrusallık, doğruluk, kesinlik ve duyarlılık kriterlerini karşıladığı validasyon çalışmaları ile gösterilmiştir.

### **5.3. Mikronaltı/Nano-boyutta Selekoksisb Bileşimlerinin Hazırlanması: Ön Tarama Deneyleri**

Suda çözünürlüğü düşük olan selekoksisbin, çözünürlüğünü ve çözünme hızını arttırmak için 2.3.5. bölümünde anlatıldığı gibi birçok farklı teknik ile çalışmalar yapılmıştır. Tez kapsamında ticarileşme potansiyeli yüksek, endüstriye hızlı bir şekilde transfer edilebilecek bir formülasyon ve üretim işlemi geliştirilmek istendiği için bu yöntemler içerisinde kuru öğütme yönteminin kullanılmasına karar verilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda tek başına etkin maddenin öğütülmesinin yanı sıra, hidrofilik yardımcı maddeler kullanılarak birlikte kuru öğütme yapılması sonucu çözünürlüğün ve çözünme hızının çok daha fazla artırıldığı bildirilmiştir (34, 55-58, 60, 61, 65, 69-72). Literatürde yer alan çalışmalar, selekoksisbin fizikokimyasal özellikleri ve Celebrex® Kapsül referans ürün bileşimi dikkate alınarak birlikte öğütme işleminde kullanılacak yardımcı maddeler belirlenmiştir. Birincil yardımcı



maddeler (*primary milling matrix*) olarak polivinilpirolidon, düşük süstitüeli hidroksipropil selüloz, hidroksietil selüloz, laktoz monohidrat, magnezyum aluminyum silikat, vinilpirilidon ve vinil asetat kopolimer, Soluplus® ve mannitol yardımcı maddeleri seçilmiştir (Bkz. Tablo 3.4.). Öğütme bileşimindeki birincil yardımcı maddelerin oranları, 1:1 veya literatürdeki çalışmalarda farklı etkin maddeler için tercih edilen oranlar referans alınarak belirlenmiştir (34, 39, 56, 62-65, 69, 71, 76, 105, 161, 162) Öğütme bileşiminde birincil yardımcı maddeye ek olarak noniyonik, anyonik veya katyonik yüzey etkin maddeler kullanılabilir (62-64, 161, 162). Yüzey etkin maddeler, sterik bariyer sağlayarak ve yüzey gerilimini azaltarak ince partikülün aglomerasyon eğilimini önlemek için çok önemli bir rol oynamaktadır (163). Bu nedenle ön tarama deneylerindeki öğütme bileşimlerinde yüzey etkin madde olarak sodyum lauril sülfat ve polioksil 40 stearat kullanılmıştır.

Öğütme çalışmaları için gezegen hareketli bilyalı değirmen kullanılmıştır ve ön tarama deneylerinde literatürde verilen kritik öğütme işlem parametreleri dikkate alınarak öğütme koşulları belirlenmiştir. Genel bilgiler doğrultusunda; bilya:toz ağırlık oranının, öğütme hızının ve öğütme süresinin yüksek olması mekanik etkinin artmasını, buna bağlı olarak da daha küçük partiküllerin elde edilmesini sağlamaktadır (30, 34, 46, 47). Bu doğrultuda bilya:toz ağırlık oranı 15:1, öğütme hızı 500 devir/dk ve öğütme süresi 4 saat olarak uygulanmıştır.

Birlikte öğütme işlemi ile mikronaltı/nano-boyutta selekoksib bileşimlerinin elde edilmesi hedeflendiği için formülasyonların partikül büyüklüğü testleri yapılmıştır. Kullanılan yardımcı maddelerin çözünürlüğe etkisini görebilmek ve formülasyonlar arasındaki çözünürlük farkını büyük ölçüde değerlendirebilmek için selekoksibin en yüksek çözünürlüğe sahip olduğu pH 12 çözünme ortamında intrinsik çözünme hızı testleri yapılmıştır.

Selekoksibin tek başına öğütülmesi ile 606 nm boyutunda partiküller elde edilmiştir. Ancak selekoksibin hidrofobik olması, ıslanabilirliğinin düşük olması ve kuru öğütme sonrası aglomerasyon gözlenmesi nedeniyle çözünürlüğün artmadığı düşünülmektedir (45, 163). Birlikte öğütme işlemi sonucu tüm formülasyonlar için mikronaltı partiküller elde edilmiştir (Bkz. Tablo 4.11.). Ancak yüzey etkin madde kullanılan formülasyonlarda öğütme performansı artırıldığı, partiküller arası yüzey gerilimi düşürüldüğü için daha düşük partikül büyüklüğü sonuçları elde edildiği

düşünülmektedir (163). Celebrex® Kapsül referans ürününde SLS yer aldığı ve güvenilirliği test edilmiş olduğu için yüzey etkin madde olarak SLS'nin kullanılmasına karar verilmiştir. PVP ile yapılan öğütmelerde selekoksibin çözünürlüğü yüksek değerlere ulaşmış; ancak amorf yapıda selekoksib elde edilmiştir (Bkz. Şekil 4.10., Şekil 4.11.). PVP'nin, selekoksib ve birçok farklı etkin maddenin potansiyel fonksiyonel grupları ile hidrojen bağı yaptığı ve bu şekilde amorf katı dispersiyonlar oluşturarak çözünürlüğü arttırdığı bilinmektedir (104, 106, 107).

Birlikte öğütme sonucu selekoksibin stabil amorf, kristal veya amorf-kristal karışım şekillerinin üretilmesi hedeflendiği için polimorfik değişimin nasıl inhibe edileceğine ilişkin araştırmalar yapılmıştır. Bhatt ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada manitolün, amorf selekoksib ile katı dispersiyonunun hazırlanması sonucu selekoksibin kristalleşmesini indüklediği belirtilmiştir (164). Bu doğrultuda öğütme bileşimine PVP'ye ek olarak manitol eklendiğinde amorf şekle dönüşümün azaldığı saptanmış (Bkz. Şekil 4.10.), bu nedenle öğütme bileşime manitol eklenmesine karar verilmiştir. Daha sonra yapılan optimizasyon çalışmaları ile değişikliğin derecesinin PVP ve manitol arasındaki orana bağlı olduğu belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.34.).

pH 12'de intrinsik çözünme hızı yüksek olan formülasyonlardan F03, F14, F20, F21 ve F22 için pH 1,2+%0,2 SLS çözünme ortamında intrinsik çözünme hızı testi yapılmıştır. Öğütme bileşiminde PVP içeren formülasyonun, pH 12'deki çözünmüş selekoksib miktarı yüksek olmasına rağmen, fizyolojik bir çözünme ortamını taklit eden pH 1,2+%0,2 SLS ortamındaki çözünmüş selekoksib miktarı daha düşüktür (Bkz. Tablo 4.12.). Öğütme bileşimine manitol eklenmesi sonucu pH 1,2+%0,2 SLS'deki çözünmüş miktarın arttığı görülmüştür. Mannitolün polimorfik yapı değişikliğine etkisinin yanı sıra fizyolojik ortamlardaki çözünürlüğü artırma etkisi literatürde yer alan ve mekanizması bilinen bir etki değildir. Ancak manitolün hidrofilik bir taşıyıcı olması, selekoksib partiküllerinin yüzeyine tutunması ve bu sayede çözünürlüğü artırdığı düşünülmektedir.

Tablo 4.11.'de verildiği üzere farklı molekül ağırlıklarında PVP tipleri ile öğütme çalışmaları yapılmıştır. *In vitro* çalışmalarda PVP'nin molekül ağırlığının ve dolayısı ile viskozitesinin belirgin bir etkisi gözlenmemiştir. Literatürde bu konu ile ilgili yer alan bilgiler, *in vitro* çözünme testleri açısından molekül ağırlığının farklılık

oluşturmadığı yönündedir (163). Bu nedenle çalışmamızda daha düşük molekül ağırlığına ve viskoziteye sahip olan PVP K12 ile ilerlenmesine karar verilmiştir.

Ön tarama deneylerinde elde edilen bulgulara dayanarak selekoksib, PVP, mannitol ve SLS içeren öğütme bileşimlerinin deney tasarımı ile ayrıntılı olarak araştırılmasına ve optimize edilmesine karar verilmiştir.

#### **5.4. Birlikte Öğütülmüş Selekoksib Bileşimlerinin Kritik Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi**

Selekoksib BCS Sınıf 2 grubunda yer alan ve absorpsiyonunda hız kısıtlayıcı basamağın çözünürlük ve çözünme hızının olduğu bir moleküldür. Literatürde, selekoksibin biyoyararlanımını artırmak amacıyla ilk olarak çözünürlük ve çözünme hızı özelliklerinin iyileştirilmesi hedeflenmiş ve bunu sağlayabilmek için birçok farklı formülasyon ve üretim tekniği kullanılmıştır (104-108). Tez kapsamında çözünürlüğün artırılması için endüstriye en uygun yöntemlerden birisi olması ve ekonomik olması nedeniyle birlikte kuru öğütme yönteminin kullanılmasına karar verilmiştir. Bu yöntem ile literatürde de belirtildiği gibi partikül büyüklüğünün küçültülmesi ve katı dispersiyonların hazırlanması amaçlanmıştır (62-64, 161, 162). Dolayısı ile optimum birlikte öğütülmüş selekoksib bileşimi için sudaki çözünürlük ve partikül büyüklüğü kritik kalite özelliği olarak belirlenmiştir. Selekoksibin en yüksek çözünürlüğe sahip olduğu pH 12 ve fizyolojik bir çözünme ortamını taklit eden pH 1,2+%0,2 SLS çözünme ortamındaki intrinsik çözünme hızı, formülasyonların çözünme hızı açısından belirleyici olması nedeniyle selekoksib bileşimleri için kritik kalite özelliği olarak değerlendirilmiştir.

#### **5.5. Birlikte Öğütülmüş Selekoksib Bileşimleri için Kritik Formülasyon ve Üretim İşlem Parametrelerinin (Bağımsız Değişkenlerin) Seçilmesi, Risk Değerlendirmesinin Yapılması ve Optimizasyon Çalışmaları**

Tez kapsamındaki çalışmalarda selekoksibin çözünürlüğünü ve çözünme hızını artırmak için birlikte kuru öğütme işlemi seçilmiş ve öğütme işlemi, gezegen hareketli bilyalı değirmende yapılmıştır. Literatür bilgisi temel alınarak ön tarama deneyleri yapılmış, öğütme bileşiminde yer alacak yardımcı maddeler belirlenmiştir. Bu maddelerden PVP ve mannitol birincil öğütme bileşenleri olarak, SLS yüzey etkin

madde olarak kullanılmıştır. Seçilen formülasyon ve üretim işlem parametrelerinin birlikte öğütülmüş selekoksib bileşimleri üzerindeki potansiyel riskleri balık kılıcı (Ishikawa) diyagramı ile değerlendirilmiş, etkili olacağı düşünülen 16 parametre belirlenmiş ve bu parametrelerden 6'sının etkisi deney tasarımları ile kapsamlı olarak incelenmiştir.

Bağımsız değişken olarak isimlendirilen kritik formülasyon ve üretim işlem parametrelerinin hedeflenen ürün özelliklerini nasıl etkilediğini belirlemek ve optimum formülasyonu tasarlamak amacıyla 3 farklı deney tasarımı uygulanmıştır. İlk olarak risk değerlendirmesinin yapılabilmesi, çok sayıda değişkenin iki düzeyde test edilerek anlamlılık derecesinin belirlenmesi için Plackett-Burman deney tasarımı uygulanmıştır. Ancak istatistiksel olarak anlamlı değişkenlerin cevap değişkeni üzerindeki etkisini matematiksel modellerle açıklamak ve formülasyonu, üretim işlemini optimize etmek için Box-Behnken, merkezi kompozit (*Central Composite*) gibi ikinci dereceden ve çözümlülüğü daha yüksek modellerin uygulanması gereklidir (22, 83). Alışıl gelmiş deney tasarımlarında değişkenlerin etkisini inceleyebilmek için çok sayıda deney gerekmesi ve bu tasarımların, değişkenlerin birbiri ile olan etkileşimlerini belirleyememesi nedeniyle, istatistiksel deney tasarımları yaygın olarak kullanılmaktadır. Plackett-Burman, faktöriyel tasarım, Box-Behnken, merkezi kompozit deney tasarımı gibi istatistiksel tasarımların sunduğu deney sayısını azaltarak, hedeflenen ürün profiline hızlı bir şekilde ulaşılmasını sağlamak için, çalışmamızda farmasötik teknoloji alanında henüz yaygın bir kullanımı olmayan Bayes optimizasyonu (BO) da kullanılmıştır. BO'da her bir deneyin sonucu bir sonraki deney tasarımı için veri olarak kullanılmakta ve bir sonraki deney bu bilgiler doğrultusunda tasarlanmaktadır. Bu durum BO tasarımını sürekli öğrenmeye itmekte ve bilgi düzeyinin artması sonucu daha az deney ile hedefe ulaşılmasını sağlamaktadır (23).

Tez çalışmamız kapsamında uygulanan ilk deney tasarımı, 6 bağımsız değişkenin 4 yanıt değişkeni üzerindeki etkisini belirleyebilmek için 12 deneyli, 0 merkez noktalı Plackett-Burman deney tasarımıdır. Plackett-Burman deney tasarımı, 6 bağımsız değişkenin anlamlılık derecesine göre sınıflandırılmasını sağlamak için kullanılmıştır (83, 84). Bu aşamada bağımsız değişkenlerin alt ve üst düzeylerinin doğru olarak belirlenmesi oldukça önemlidir. Alt ve üst düzeyler arasındaki aralığın

çok dar olması sonucu anlamlı bir etken anlamsız olarak değerlendirilebilir veya aralığın çok geniş olması anlamsız bir etkenin anlamlı olarak değerlendirilmesine yol açabilir. Plackett-Burman deney tasarımındaki bağımsız değişkenlerden; öğütme hızı düzeylerine bilyalı değirmenin çalışabileceği en yüksek hız ve etkili olarak çalışabileceği en düşük hız değerlendirilerek karar verilmiştir. Laboratuvarımızdaki gezegen hareketli bilyalı değirmenin etkili bir şekilde çalışabileceği en yüksek dönüş hızı 500 devir/dk; bilyalar ve öğütülecek tozun mekanik etkileşimini sağlaması için en düşük etkili dönüş hızı 250 devir/dk'dır. Öğütme süresi düzeyleri ise, ön tarama deneyleri doğrultusunda edinilen bilgiler temel alınarak 4 saat ve 1 saat olarak belirlenmiştir. Deney tasarımı ile birlikte kuru öğütme için, etkili ve en kısa öğütme süresinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bilya:toz oranı düzeyi, öğütme performansı açısından kritik olduğu düşünülen bir diğer etkendir. Burada üretim seri miktarının mümkün oldukça yüksek olmasını sağlamak için öğütülecek toz miktarının yüksek olması istenmiştir. Ancak mekanik etkinin bilyalar ve bilyaların hareketi ile sağlanması nedeniyle bilya oranının yüksek olması, öğütme etkinliğinin artırılması açısından kritik olabilmektedir. Bu doğrultuda bilya:toz oranı alt düzeyi 5 ve üst düzeyi 15 olarak belirlenmiştir. PVP, SLS ve mannitol oranları için ön tarama deneylerinde kullanılan alt ve üst düzey değerleri Plackett-Burman deney tasarımında da kullanılmıştır (Bkz. Tablo 3.5., Tablo 3.6.). Deney tasarımının oluşturulması ve deney sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi için Minitab® 19 (Minitab Inc., ABD) yazılımı kullanılmıştır.

Optimizasyon çalışmaları için kullanılan merkezi kompozit deney tasarımının, alt ve üst düzeyler dışında, ortogonal olarak bloke edilen iki blok tasarımında 1,633 alfa değeri ile daha geniş bir tarama aralığı sağlaması ikinci dereceden diğer tasarımlara göre üstünlük sağlayan bir özelliktir (83-87). Plackett-Burman deney tasarımı ile istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenen bağımsız değişkenlerin optimum değerini belirleyebilmek amacıyla 3 etkenli, 3 düzeyli, 8 küp noktası, küpte 4 merkez noktası, 6 eksen noktası ve eksenelde 2 merkez noktası içeren bir merkezi kompozit deney tasarımı ile optimizasyon yapılmıştır. Bağımsız değişkenlerin düzeyleri, Plackett-Burman deney tasarımındaki alt ve üst düzeyleri doğrudan alınarak ve orta düzeyler, düşük ve yüksek düzeylerin orta noktası olacak şekilde belirlenmiştir. Deney matrisinin oluşturulması, randomizasyonu, veri işleme, istatistiksel analizler ve

cevap yüzey grafiklerinin oluşturulması için Design Expert® 13 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, ABD) yazılımı kullanılmıştır (Bkz. Tablo 3.7., Tablo 3.9).

Birlikte öğütülmüş selekoksib bileşimlerinin optimize edilmesi için kullanılan bir diğer tasarım BO'dur. BO deney tasarımında Gauss süreci (GP) vekil modeli oluşturmak için merkezi kompozit deney tasarımında yapılan 8 deney ve bu deneylere ilişkin  $Y_2$  (pH 1,2+%0.2 SLS'de 120.dakikada çözünmüş selekoksib miktarı) yanıt değişken sonuçları kullanılmıştır (Bkz. Tablo 3.10.). Selekoksibin fizyolojik ortamdaki çözünme hızı açısından  $Y_2$  yanıt değişkenin,  $Y_1$  (pH 12'de 30. dakikada çözünmüş selekoksib miktarı)'den kritik olması nedeniyle  $Y_2$ , BO deney tasarımı için yanıt değişkeni olarak seçilmiştir. Bu veriler ile BO deney tasarımının ilk 2 deneyi belirlenmiştir. İlk iki deneye ilişkin deney sonuçları ile vekil modelden Beklenen İyileştirme (EI) ve Güven Sınırı (CB) edinme fonksiyonları kullanılarak yeni 2 deney için girdi önerisi alınmıştır. Benzer şekilde her yinelemede iki deney yapılmış ve toplam 6 yinelemede deney tasarımı tamamlanmıştır (Bkz. Tablo 4.18.). Deneylere ilişkin çıktıları değerlendirerek yeni deneylerin tasarlanması için R istatistiksel yazılımındaki MLRMO paketi kullanılmıştır (148).

### **5.6. Kritik Formülasyon ve Üretim İşlem Parametrelerinin (Bağımsız Değişkenlerin) Yanıt Değişkenler Üzerine Etkilerinin Değerlendirmesi**

Placket-Burman deney tasarımında bağımsız değişkenlerin, partikül büyüklüğü ( $Y_1$ ), pH 12'de 30. dakikada çözünmüş selekoksib miktarı ( $Y_2$ ), pH 1,2+%0,2 SLS'de 120. dakikada çözünmüş selekoksib miktarı ( $Y_3$ ) ve sudaki çözünürlük ( $Y_4$ ) yanıt değişkenleri üzerine etkileri varyans analiz sonuçları ile değerlendirilmiştir.

Literatürde yer alan bilgiler doğrultusunda öğütme hızının ve öğütme süresinin artırılması sonucu daha küçük partiküller elde edilmesi beklenirken, öğütme bileşiminde yer alan yardımcı maddeler, bu maddelerin kullanım oranları ve selekoksib ile kimyasal etkileşimleri nedeniyle partikül büyüklüğünün arttığı düşünülmektedir (Tablo 4.13.) Tüm formülasyonlarda ortalama partikül büyüklüğü mikronaltı boyuta düşürüldüğü için bu boyutun altında birlikte kuru öğütme işleminin mekanik etkisinin, kimyasal etkileşim etkisi tarafından baskılandığı düşünülmektedir.

En düşük ortalama partikül büyüklüğünün elde edilmesinde, öğütme hızının ve süresinin mekanik etkisinin dışında bilya:toz oranı ile sağlanan mekanik etkinin belirleyici olduğu görülmüştür (Bkz. Tablo 4.14.). SLS'nin artırılması sonucu aglomerasyonun önlenmesine bağlı olarak daha küçük partiküller elde edilmiştir. Benzer şekilde PVP'nin de artırılması sonucu yüzey geriliminin azaltılması ile daha küçük partiküller elde edilmiştir. Ancak mannitolün, öğütme işleminde diğer yardımcı maddelere kıyasla ortalama partikül büyüklüğünü küçültmek için daha fazla mekanik etkiye gereksinim duyması ve kristal yapısından dolayı kırılma eşik değerinin yüksek olması nedenleriyle ortalama partikül büyüklüğünün değişiminde negatif etkiye sahip olduğu bulgusuna ulaşılmıştır (Bkz. Şekil 4.14.).

pH 12'de en yüksek çözülmüş selekoksib miktarı, yüksek değerlerde PVP, mannitol, öğütme süresi ve bilya:toz oranı kullanıldığında elde edilmiştir (Bkz. Tablo 4.13.). Öğütme hızının artması daha önemsiz ancak negatif yönde etkilerken SLS'nin artması çözülmüş selekoksib miktarını etkilememiştir (Bkz. Şekil 4.16.). Bu durumun, selekoksibin pKa değerinden dolayı yüksek pH değerlerinde çözünmesi için yüzey etkin maddeye daha az gereksinim duymasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

pH 1,2+%0.2 SLS'de çözülmüş en yüksek selekoksib miktarı ve sudaki en yüksek çözünürlük değeri, yüksek değerlerde PVP, mannitol, SLS ve bilya:toz oranı kullanıldığında elde edilmiştir (Bkz. Tablo 4.13.). Yüksek öğütme hızının ve uzun öğütme süresinin tekrar aglomerasyona neden olma olasılığından ve/veya kimyasal etkileşimin etkinliğinin azalmasından dolayı negatif etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda mannitolün, PVP'nin selekoksib ile hidrojen bağı yapmasını engellemesinin yanı sıra uzun öğütme sürelerinde PVP'nin selekoksibin çözünürlüğünü ve ıslanabilirliğini artırma üzerindeki etkisini azalttığı düşünülmektedir.

Plackett-Burman deney tasarımında yer alan 12 farklı formülasyonun pH 12 ve pH 1,2+%0,2 SLS çözünme ortamlarında yapılan intrinsik çözünme hızı testinde ve sudaki çözünürlük testinde en yüksek çözülmüş selekoksib miktarına sahip formülasyonların en düşük partikül büyüklüğündeki formülasyonlar olmadığı belirlenmiştir (Bkz. Tablo 4.13.). Çözülmüş selekoksib miktarının artırılması için partikül büyüklüğünün küçültülmesine ek olarak formülasyonda yer alan yardımcı maddeler ve bu maddelerin kullanım oranları ile oluşturulan selekoksib katı

dispersiyonları ile sağlandığı düşünülmektedir. Bu nedenle mikronaltı/nano-boyuttaki selekoksib bileşimlerinin optimizasyonu için oluşturulan merkezi kompozit deney tasarımında partikül büyüklüğü yanıt değişkeni olarak değerlendirilmemiştir. Sudaki çözünürlük ve pH 1,2+%0,2 SLS çözünme ortamında yapılan intrinsik çözünme hızı testleri birbirini destekleyen ve formülasyonun çözünürlük değerini benzer şekilde ifade eden yanıt değişkenleridir. Bu nedenle *in vivo* ortamı taklit eden pH 1,2+%0,2 SLS ortamında yapılan intrinsik çözünme hızı testi daha anlamlı bir yanıt değişkeni olarak değerlendirilmiştir. Sudaki çözünürlük, selekoksib bileşimlerinin optimizasyonu için oluşturulan merkezi kompozit deney tasarımında yanıt değişkeni olarak kullanılmamıştır.

Merkezi kompozit deney tasarımından elde edilen verilerin analizi aşamasında, PVP:CXB, SLS:CXB ve MAN:CXB bağımsız değişkenlerinin ve bu değişkenlerin birbiri ile etkileşiminin yanıt değişkenleri üzere etkisinin en iyi şekilde açıklanacağı ikinci dereceden model seçilmiştir. Yanıt değişkenleri üzerinde anlamlı etkiye sahip bağımsız değişkenlerin etkisini daha ayrıntılı değerlendirebilmek için üç boyutlu cevap yüzey grafikleri ve kontur grafikleri oluşturulmuştur (Bkz. Şekil 4.22., Şekil 4.23., Şekil 4.24., Şekil 4.25.).

Üç boyutlu cevap yüzey grafikleri ve kontur grafikleri, üç bağımsız değişkenden birinin sabit değerde kullanıldığında, diğer iki değişkenin yanıt değişkeni üzerindeki etkilerinin daha iyi değerlendirilmesini sağlamaktadır. Şekil 4.22. ve 4.23.'te verildiği gibi,  $X_3$  değeri 1 olarak sabit tutulduğunda,  $Y_1$  yanıt değişkeninin artan  $X_1$  değerleri ile arttığı, ancak  $X_1$ 'in 0,6'dan düşük olduğu durumlarda  $X_2$ 'deki değişikliğin  $Y_1$ 'i etkilemediği ve 1'den yüksek olduğu durumlarda  $X_2$ 'deki artışının  $Y_1$ 'i arttırdığı saptanmıştır. En yüksek  $Y_1$  değerini sağlayabilmek için  $X_1$ 'in en yüksek değerde,  $X_2$ 'nin 0,15-0,2 aralığında olması gerektiği sonucuna varılmıştır. Bu sonuç, öğütme bileşiminde yer alan PVP'nin çözünürlüğü ve çözünme hızını artırmak için SLS'den daha baskın bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.  $X_2$  değeri 0,15 olarak sabit tutulduğunda,  $X_1$  ve  $X_3$  değerlerinin artması  $Y_1$  yanıt değişkeninin artmasını sağlamaktadır. Ancak 1'den düşük  $X_3$  değerinde daha yüksek  $X_1$  kullanılması gereklidir. Son kombinasyon olarak  $X_1$  değeri 1,5 olarak sabit tutulduğunda,  $X_2$  ve  $X_3$ 'ün artması  $Y_1$  yanıt değişkeninin daha yüksek değerlerde olmasını sağlamaktadır.



Şekil 4.24. ve 4.25.'te verilen grafiklerde,  $Y_2$  için bağımsız değişkenlerin etkileşimleri incelendiğinde,  $X_3$  değeri 1 olarak sabit tutulduğunda,  $X_2$ 'nin 0,1'in üzerinde olması durumunda  $X_1$ 'deki artış  $Y_2$ 'yi arttırabilmektedir. Bu durum,  $Y_1$ 'in aksine selekoksibin zayıf asidik olmasından dolayı asidik pH değerinde çözünme hızının artması için daha yüksek oranlarda yüzey etkin maddeye gereksinimi olduğunu göstermektedir. Ancak tek başına  $X_2$ 'nin yüksek olması yeterli değildir ve 1'den yüksek  $X_1$  değerlerinden sonra  $Y_2$  üzerinde pozitif etki göstermeye başlamaktadır. Bu sonuç yüksek  $Y_2$  için, PVP ve SLS'nin özgül oranlarda kullanılması gerektiğini göstermektedir.  $X_2$  değeri 0,15 olarak sabit tutulduğunda,  $X_1$  değerinin artması  $Y_1$  yanıt değişkeninin artmasını sağlamaktadır. Ancak  $X_1$  değeri 1,1 olana kadar  $X_3$ 'ün artması çözünmüş miktarı önemli ölçüde değiştirmemiş, 1,1 seviyesinden sonra ise  $X_3$ 'ün artması sonucu pozitif yönde değiştirmiştir. Bu durumun mannitolün selekoksibin PVP ile hidrojen bağı yapmasını engellemesi için gereken oranın, PVP'nin çözünürlüğün artmasını sağlayacak oranı baskılamaması gerektiği ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Son kombinasyon olarak  $X_1$  değeri 1,5 olarak sabit tutulduğunda,  $X_2$ 'nin artması  $Y_2$  yanıt değişkeninin daha yüksek değerlerde olmasını sağlamaktadır. Ancak  $X_3$  iki aşamalı bir etkiye sahiptir. İlk aşamada, 0,1'in altındaki  $X_2$  değerlerinde,  $X_3$ 'ün artması  $Y_2$ 'yi etkilememiş ve en düşük değerlerde sonuçlar alınmasına neden olmuştur. İkinci aşamada ise 0,1'in üzerindeki  $X_2$  değerlerinde,  $X_3$ 'ün artması  $Y_2$ 'yi pozitif olarak etkilemiştir. Bu sonuçların selekoksibin pKa değerinin bir fonksiyonu olduğu, asidik ortamlarda çözünmediği, asidik ortamlarda çözünebilmesi için de yüzey etkin maddeye gereksinim duyması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak; birincil öğütme bileşeni olan PVP ve mannitolün hidrofilik maddeler olması ve bu maddelerin kristal veya kristal-amorf karışımı selekoksibin yüzeyini kaplaması, partiküllerin yüzey gerilimini azaltması ve ıslanabilirliğini artırması mekanizmalarına bağlı olarak daha yüksek çözünürlük ve çözünme hızı değerleri elde edilmiştir. Kuru öğütme işleminde SLS'nin eklenmesi ile öğütme performansının arttırılması sonucu partikül büyüklüğü küçültülerek ve selekoksib partiküllerinin ıslanabilirliği arttırılarak çözünürlüğü arttırılmış mikronaltı/nano-boyutta selekoksib bileşimleri elde edilmiştir.

BO ile deney tasarımında  $X_1$ ,  $X_2$  ve  $X_3$  için ilk olarak geniş bir aralık taranmış, maksimum  $Y_2$  değerine nasıl ulaşacağı GS modeli kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Tez kapsamında yapılan çalışmalarda, ilk 6 deneyde alt ve üst düzeyler arasında tarama yaptıktan sonra her değişkenin yanıt değişkeni nasıl etkilediği ile ilgili modelin bilgi düzeyi artmıştır. Tasarımın, tahmin edilen ve gerçek değerler arasındaki bağlantı noktalarının artması sonucunda, yedinci deneyden itibaren model, benzer deney tasarımları önermeye başlamıştır ve BO07-BO12 aralığındaki deneylerde  $X_1$  ve  $X_2$  için “yararlanma”,  $X_3$  için “keşfetme” stratejisi ile birbirine benzer deneyler önerilmiştir (Bkz. Tablo 4.18.). BO deney tasarımı, hedef değere yaklaştığı kararını verdiğinde tarama sıklığını daraltmaktadır, bu sayede özgül bağımsız değişken değerleri ile çalışılarak hedefe ulaşılmasını sağlamaktadır. Merkezi kompozit deney tasarımının sunduğu 20 formülasyona ilişkin  $Y_1$  ve  $Y_2$  verileri kullanılarak yapılan analizler, bu analizlerin üç boyutlu cevap yüzey grafikleri ve kontur grafikleri ile görselleştirilmesi sonucu bağımsız değişkenlerin etkileri hakkında bilgi sahibi olunmuştur. Ancak BO ile ilk 6 formülasyondan sonra tasarlanan formülasyonlar, merkezi kompozit tasarımın önerdiği optimum formülasyonlara çok benzer tasarımlara sahiptir. BO'nun sürekli öğrenen bir tasarım ağına sahip olması, merkezi kompozit deney tasarımından edinilen 8 deneye ilişkin bulgular ve ardından yapılan 6 deneysel çalışma sonucunda optimum formülasyon tasarımı hakkında bilgi edinilmesini sağlamıştır. Merkezi kompozit deney tasarımında, yapılan 20 deneye ilişkin verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinden sonra optimum formülasyon belirlenebilirken; BO, 15. deneyden (merkezi kompozit deney tasarımında alınan 8 deney ve BO ile yapılan ilk 7 deneyin kümülatif değerlendirmesi) itibaren optimum formülasyon tasarımına yakın formülasyonlar önermeye başlamıştır. Sonuç olarak bu bulgular, BO'nun yaygın kullanılan ikinci dereceden deney tasarımlarından daha az deney ile hedefe ulaşılabilirliğini göstermektedir.

*In vitro* ve *in vivo* çalışmalarda kullanılacak formülasyonun belirlenmesi için merkezi kompozit ve BO tasarımından elde edilen sonuçlar kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir. Merkezi kompozit deney tasarımına ilişkin matematiksel modelde  $Y_1$  ve  $Y_2$  yanıt değişkenleri için hedef değerler sırasıyla  $>70$  mg/500 mL ve  $>40$  mg/500 mL olmuştur. Tablo 4.17.'de verilen ve merkezi kompozit modeli tarafından sunulan üç farklı formülasyon için deneysel çalışmalar yapılmıştır. Yapılan deneysel

çalışmalar sonucunda optimum bileşimdeki PVP:CXB, SLS:CXB ve MAN:CXB ağırlık oranları sırasıyla 1,5; 0,2; 0,5 olmuştur. Bu bileşim “birlikte öğütülmüş optimum selekoksib bileşimi” olarak isimlendirilmiş ve bu bileşimlerin fizikokimyasal özellikleri karakterize edilmiştir.

### **5.7. Mikronaltı/Nano-boyutta Selekoksib Bileşimlerinin Fizikokimyasal Özelliklerinin Değerlendirilmesi**

Merkezi kompozit deney tasarımı ile optimize edilen birlikte öğütülmüş selekoksib bileşimlerinin fizikokimyasal karakterizasyonu kapsamında çözünürlük, intrinsik çözünme hızı, DSC, FTIR, XRD, PSD, SEM ve stabilite analizleri yapılmıştır. Karakterizasyon çalışmalarında, doğru bir değerlendirme yapabilmek için işlem görmemiş selekoksib, optimum bileşime ilişkin ilişkin fiziksel karışım ve referans ürün Celebrex® Kapsül için de aynı çalışmalar eş zamanlı olarak yürütülmüştür.

#### **Çözünürlük**

Çözünürlük testi, genellikle suda ve fizyolojik pH değerlerindeki çözücülerde yapılmaktadır (126, 149). Ancak selekoksibin sudaki çözünürlüğünün çok düşük olması nedeniyle ve formülasyonlar için yapılacak çözünme testlerinde sink koşulun sağlanabilmesi için çözünürlük bilgisine gereksinim duyulması nedeniyle %0,2 oranında SLS içeren pH 1,2; pH 4,5 ve pH 6,8 ortamları ile çalışılmıştır.

İşlem görmemiş selekoksib, fiziksel karışım ve Celebrex® Kapsül'ün tüm ortamlardaki çözünürlük değerleri birbirine yakın bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.19.). Sonuçların birbirine yakın olması, formülasyonlarda yer alan yardımcı maddelerin fiziksel karışım halinde veya yaş granülasyonda kullanılması halinde selekoksibin çözünürlüğünü önemli oranda değiştirecek etkiye sahip olmadığını göstermektedir. Optimum birlikte öğütülmüş selekoksibin su dışındaki ortamlarda çözünürlüğünün, etkin madde, fiziksel karışım ve referans üründen en az 2 kat, suda ise 4,8 kat yüksek olduğu görülmektedir (Bkz. Tablo 4.19., Şekil 4.26.). Bu durum; selekoksibin partikül büyüklüğünün maksimum 350 nm olması ve öğütme bileşimindeki yardımcı maddeler ile kimyasal etkileşimi sonucu ıslanabilirliği artırılmış bir katı dispersiyonun üretilmiş olması ile açıklanabilir.

## İntrinsik Çözünme Hızı

İntrinsik çözünme hızı, çözünürlükten farklı olarak etkin maddenin çözünme özelliği ile ilgili bilgi vermektedir. Çözünme hızı; sabit sıcaklık, çözünme ortamı ve yüzeyden birim zamanda çözücüye geçen madde miktarı olarak tanımlanmaktadır. Çözünmenin “film teorisi” veya “difüzyon katman modeli” teorilerine göre çözünme oranının katı transferine dayandığı bildirilmiştir. 1855 yılında Fick tarafından oluşturulan çözünme eşitlikleri devam eden yıllarda bu eşitliğe yüzey alanının, difüzyon katsayısının, katı partikül yüzey alanı gibi değişkenlerin de eklenmesi ile geliştirilmiştir (133, 165-168).

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda sabit deney koşullarında (sıcaklık, çözünme ortamı, karıştırma hızı gibi) sabit 0,5 cm<sup>2</sup>'lik yüzey alanından birim zamanda çözünme ortamına geçen (çözünmüş) selekoksib miktarını belirleyebilmek için intrinsik çözünme hızı (*intrinsic dissolution rate*-IDR) testleri yapılmıştır. Optimum selekoksib bileşimine ilişkin IDR değeri, bu bileşim ile geliştirilecek kapsül formülasyonunun çözünme hızı için temel bilginin alt yapısını oluşturmuştur. IDR testinde sabit bir yüzeyden çözünmenin olması sonuçların doğru değerlendirilmesi açısından önemlidir. Yüzey alanının bütünlüğü bozulduğunda çözünme ortamı ile temas eden katı yüzey alanının değişmesinden dolayı çözünme sıfıncı derece olmaktan çıkmaktadır (134). Bu nedenle IDR sonuçları, çözünmenin doğrusal bir şekilde arttığı son zaman noktasına kadar (pH 1,2+ $\pm$ 0,2 SLS; pH 4,5+ $\pm$ 0,2 SLS ve pH 6,8+ $\pm$ 0,2 SLS için ilk 15 dakika, pH 12 için ilk 5 dakika) birim yüzeyden (cm<sup>2</sup>) çözünmüş selekoksib miktarlarının zamana karşı grafiğe geçirilmesi ile gösterilmiştir (Bkz. Şekil 4.27.) Optimum birlikte öğütülmüş selekoksibin IDR'si, daha yüksek çözünürlüğe ve ıslanabilirliğe sahip olduğu için tüm ortamlarda işlem görmemiş selekoksib, fiziksel karışım ve Celebrex® Kapsül'den daha yüksektir (Bkz. Tablo 4.25.). Fiziksel karışım ve işlem görmemiş selekoksibin IDR sonuçları arasındaki fark, öğütme bileşiminde yer alan maddelerin etkisinden dolayı kabul edilebilir düzeydedir. Celebrex® Kapsül'ün intrinsik çözünme hızının, selekoksib etkin maddesinden önemli ölçüde daha yüksek olmasının nedeni formülasyondaki yüksek miktardaki sodyum lauril sülfat, granüllerin ıslanabilirliğini artıran yağ granülasyon yöntemi ve ortam ile hızlı etkileşim sonucu granüllerin hızlı parçalanmasını sağlayan süper dağıtıcıya bağlı olabilir. Çalışmamızda pH 1,2+ $\pm$ 0,2 SLS; pH 4,5+ $\pm$ 0,2 SLS ve pH 6,8+ $\pm$ 0,2 SLS ve

pH 12 ortamlarına ek olarak FASSIF ortamında yapılan IDR testinde sadece optimum bileşim ve Celebrex® Kapsül karşılaştırılmıştır. Optimum bileşim tüm zaman noktalarında referans üründen 1,7 kat daha fazla çözünmüştür (Bkz. Tablo 4.24., Şekil 4.29.).

### DSC

DSC, etkin maddelerin fizikokimyasal durumu hakkında bilgi sağlayan bir analizdir. Kuru öğütme işlemi ile kristal yapıdaki etkin maddelerin amorf şekle dönüşme olasılığının bulunduğu literatürde yer alan bir bilgidir (59, 60). Aynı zamanda PVP ile yapılan birlikte öğütme (*co-milling*) işlemi, Bölüm 2.1.4.'te anlatıldığı gibi amorf katı dispersiyonlar üretmek için uygulanan bir yöntemdir. Birlikte öğütme sonucunda selekoksibin amorf şekle dönüşmesi, yardımcı maddeler ile moleküler dispersiyon oluşturması durumunda erime endotermi göstermemesi beklenir (25). Ön tarama deneylerinde, PVP ile yapılan öğütmelerde amorf şekillerin oluştuğu tespit edilmiştir. Ancak öğütme bileşimine mannitol eklenmesi sonucu, selekoksib ve PVP'nin hidrojen bağı yaparak amorf katı dispersiyon oluşturma olasılığının azaltıldığı hipotezi kurulmuştur. Her bir yardımcı maddenin, optimum bileşime ilişkin fiziksel karışımın ve optimum bileşimin DSC çalışmaları yapılmıştır. Fiziksel karışım ve optimum bileşimin 5°C/dk, 10°C/dk ve 15°C/dk olmak üzere üç farklı sıcaklık artış hızlarında yapılan DSC analizlerinde *onset*, *peak* ve *endset* değerleri karşılaştırılmıştır. Farklı sıcaklık artış hızlarında erime endotermelerde erimenin başladığı sıcaklığın (*onset*) birbirine yakın sıcaklıkta olması, incelenen endotermin erime endotermi olduğunu göstermektedir. Fiziksel karışıma ilişkin termogramlarda selekoksibin ve mannitolün erime endotermi, bu iki maddenin saf halleri ile birebir uyumlu olmamasına rağmen (karışım olduğu için bu beklenen bir durumdur), ayrı bir şekilde görünmektedir. Optimum bileşime ilişkin termogramda ise 5°C/dk, 10°C/dk ve 15°C/dk hızlarında gözlenen erime endoterminin *onset*, *peak* ve *endset* değerleri birbirine yakın gelmiştir (Bkz. Şekil 4.31.). Bu erime endotermine ilişkin değerlerin selekoksibin erime sıcaklığına yakın olması nedeniyle selekoksibe ilişkin olduğu düşünülmektedir. Optimum bileşime ilişkin termogramlarda mannitol ve selekoksibin ayrı ayrı gözlenmemesinin nedeninin, selekoksib, PVP ve mannitol arasındaki moleküler etkileşim ve selekoksibin bu karışım içerisinde kısmen çözünmüş

olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir. Elde edilen termogramlar; literatürde verilen farklı yardımcı maddeler ile yapılan kuru öğütmeler ile benzer bulunmuştur, ayrıca tamamen amorf forma dönüşmediğini de göstermektedir (55, 169). Bu durumu XRD ve FTIR analizleri de desteklemektedir.

### **FTIR**

Ön tarama deneylerinde PVP ile yapılan öğütmelerde selekoksibin FTIR spektrumundaki 3341 ve 3234  $\text{cm}^{-1}$ 'deki N-H bağına ilişkin piklerin kaybolduğu görülmüştür (Bkz. Şekil 4.11.) Bu durum literatürde belirtildiği üzere selekoksibin hidrofilik özellikteki amin grubu ile PVP'nin hidrojen bağı yapması sonucu amorf katı dispersiyonlar oluşturmasından kaynaklanmaktadır (104, 106, 107). Ancak öğütme bileşimine mannitol eklenmesi durumunda elde edilen optimum bileşimde 3341 ve 3234  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlenen piklerin şiddeti azalmış, mannitolün spesifik pikleri ile birleşmiş ancak kaybolmamıştır (Bkz. Şekil 4.32., Şekil 4.33.). Bu duruma selekoksibin nano-boyutta olmasının ve PVP-MAN ile oluşturduğu kimyasal etkileşimin neden olduğu düşünülmektedir. Bu bulgular, selekoksibin tamamen amorf şekle dönüşmediğini göstermektedir. Ek olarak optimum bileşimine ilişkin fiziksel karışımın FTIR spektrumunda 3341 ve 3234  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pikler, belirgin bir şekilde gözlenmiştir.

### **XRD**

XRD çalışmalarında, selekoksibin tek başına öğütülmesi sonucu hem kristal hem de kristal Form-III yapısına karakteristik olan piklerin korunduğu, sadece öğütme sonucu partikül büyüklüğünün küçülmesine bağlı olarak pik şiddetinde azalma meydana geldiği görülmüştür (Bkz. Şekil 4.34.). Bu durum kuru öğütme işlemiyle oluşan mekanik etkinin ve öğütme süresinde oluşan sıcaklığın selekoksibin polimorfik yapısını etkilemediğini göstermektedir. Ancak DSC ve FTIR analizlerinde de görüldüğü üzere sadece PVP ile yapılan öğütme sonucunda selekoksib kristal şekilden tamamen amorf şekle dönüşmüştür. Öğütme bileşimine mannitol eklenmesi sonucu kristal şekilden tamamen amorf şekle dönüşüm engellenebilmiştir. Ek olarak her iki formülasyonun da partikül büyüklüğünün 1000 nm'den küçük olması nedeniyle piklerin şiddeti azalmıştır. Bhatt ve arkadaşlarının çalışmalarına göre, mannitol

heterojen çekirdeklenme yoluyla nanokristal oluşumuna yardımcı olmakta, kristal büyümesine fiziksel bariyer sağlamaktadır (164). PVP ile birlikte öğütme sonucunda tamamen amorf şekle dönüşümün, mannitolün bu özelliği ile azaltılabileceği düşünülmüş ve öğütme bileşiminde spesifik ağırlık oranında mannitol kullanılmasına karar verilmiştir. Öğütme bileşimine mannitolün eklenmesi sonucunda hem polimorfik yapı değişikliğinin azaltıldığı hem de çözünürlüğün artırıldığı tespit edilmiştir.

### **PSD**

Merkezi kompozit deney tasarımı ile optimize edilen selekoksib bileşiminin partikül büyüklüğü hedeflendiği üzere mikronaltı/nano-boyutta elde edilmiştir (Bkz. Şekil 4.35.) Optimum birlikte öğütülmüş selekoksib bileşimindeki selekoksibin ortalama partikül büyüklüğü 184 nm olarak bulunmuştur. İşlem görmemiş selekoksib etkin maddesinin ortalama partikül büyüklüğü ise 3272 nm değerindedir. Çözünürlük ve çözünme hızı deneylerinde elde edilen sonuçlar selekoksibin partikül büyüklüğünün küçültüldüğünü desteklemektedir (Bkz. Şekil 4.26., Şekil 4.27., Şekil 4.28.)

### **SEM**

SEM mikrografları, öğütme bileşimine yüzey etkin madde eklendiğinde yüzey geriliminin azalması sonucu agregasyonun önlendiğini göstermektedir. Aynı zamanda PVP-SLS ile yapılan öğütmede partiküllerin kristalliğinin azaldığı, öğütme bileşimine mannitol eklenmesi ile kristal şekilde partiküller elde edilebildiği gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.36.). Optimum bileşime ilişkin SEM analizi ile tespit edilen ortalama partikül büyüklüğü sonuçları dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemi ile tespit edilen sonuçlar ile benzer bulunmuştur. DLS tarafından yapılan ortalama partikül büyüklüğü analizine ek olarak, SEM görüntüleri, birlikte kuru öğütme işleminin, oral biyoyararlanımı artırmak için ortalama partikül büyüklüğününün homojen bir şekilde küçülmesini sağlayabilecek bir yöntem olduğuna ilişkin bulgular sunmuştur.

### Stabilite Çalışmaları

Hızlandırılmış ve uzun dönem koşullarında yapılan 3 aylık stabilite çalışmalarında polimorfik yapıda herhangi bir değişiklik olmamıştır (Bkz. Şekil 4.37.). Selekoksib miktar tayininde ve ortalama partikül büyüklüğünde de anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiş ve başlangıç sonuçları ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Optimum formülasyon ve fiziksel karışıma ilişkin IDR analizinde ise, 120. dakika sonunda çözünmüş selekoksib miktarında meydana gelen düşüklük hızlandırılmış koşulda, uzun dönem koşuluna göre daha fazla olmuştur (Bkz. Tablo 4.26.). Bu durumun yüksek nem koşulundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak tüm sonuçların daha doğru değerlendirilebilmesi için uzun süreli stabilite sonuçlarına gereksinim vardır.

### 5.8. Formülasyon ve Çözünme Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Çözünürlüğü ve çözünme hızı artırılmış selekoksib bileşimi, etkin madde kaynağı olarak kullanılmış, Celebrex® Kapsül referans ürünü ile benzer yardımcı maddeler seçilerek kapsül formülasyonu geliştirilmiştir. Geliştirilen formülasyon, referans üründen farklı olarak doğrudan toz karışım yöntemi ile üretilmiştir. Doğrudan karışım, daha az üretim basamağı gerektirmesine bağlı olarak ekonomik bir yöntem olarak değerlendirilmiştir.

Hayvanlarda yapılacak *in vivo* farmakokinetik çalışmalardan önce selekoksib formülasyonunun Celebrex® Kapsül ile karşılaştırmalı çözünme çalışmaları yapılmıştır. Çözünme çalışmalarında sink koşulun sağlanması gereklidir, bu nedenle belirlenen ortam hacmi ile, çözünme ortamındaki maksimum etkin madde konsantrasyonunun etkin maddenin çözünürlüğünün yaklaşık %20'sini geçmemesi sağlanır (131). Aynı zamanda çözünme ortam pH değeri ve yüzey etkin madde gerekliliği etkin maddenin sırasıyla pKa değeri ve çözünürlüğü dikkate alınarak belirlenir. Selekoksibin pKa değerinin 11,1 olması nedeniyle 1,2-6,8 aralığındaki fizyolojik pH değerlerinde çözünürlüğü düşüktür ve çözünme testlerinde yüzey etkin madde kullanılması gereklidir. Dolayısı ile Celebrex® Kapsül için FDA tarafından %1 oranında SLS içeren, çözünme ortamı herhangi bir fizyolojik koşulu taklit etmeyen pH 12 olarak belirlenmiştir. Ancak *in vitro* çözünme testlerinde yüksek oranda yüzey etkin madde kullanımının formülasyonlar arası farkı maskelediği ve *in vivo* ortam ile



ilişkilendirmeyi tam olarak sağlamadığı için farklı SLS oranlarında da çözünme profilleri incelenmiştir (121). Tüm bu nedenlerden dolayı selekoksib formülasyonlarının çözünme testleri, sink koşulun sağlanması için 37 mg/kapsül (optimum formülasyon) ve 19 mg/kapsül (referans ürün) yitilikleri ile yapılmıştır. Optimum formülasyondaki selekoksibin çözünürlüğünün ve IDR'sinin referans üründen yüksek olmasının bir sonucu olarak; çözünme testlerindeki yitiliklerin farklı olmasına rağmen, optimum formülasyon tüm ortamlarda 10. dakikada %85'ten fazla çözülmüştür.

Çalışmalarımızın temel amacı, selekoksibin çözünürlüğünün, çözünme hızının dolayısı ile biyoyararlanımın artırılması, buna bağlı olarak da piyasada bulunan ve 200 mg olan yitiliğin azaltılması için yeni bir ürün geliştirilmesidir. Bu nedenle referans ürünle aynı yitilikte test ürün kullanılarak da çözünme testleri yapılmıştır. Bu işlem için sink koşulun sağlanmadığı ancak farklı SLS oranlarının kullanıldığı çözünme testleri yapılmıştır. Sink koşulda yapılan testlerden farklı olarak iki ürünün çözünürlük ve çözünme hızı farkları 200 mg yitilik ile yapılan çözünme testlerinde çok daha belirgin bir şekilde görülmüştür. SLS miktarının %0,2'den %0,5'e çıkarılması kümülatif çözülmüş selekoksib miktarını her iki ürün için de artırmıştır ancak çözünme hızları arasındaki fark benzer bir değişim profili sergilemiştir (Bkz. Şekil 4.38D, E, F). pH 1,2+%0,2 SLS; pH 4,5+%0,2 SLS ve pH 6,8+%0,2 SLS ortamlarının aksine selekoksibin pKa değeri 11.1 olan zayıf asidik bir madde olmasından dolayı pH 12 ortamındaki çözünme hızı ve çözülmüş madde miktarı çok belirgin bir şekilde yüksek bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.38.G). Selekoksibin çözünürlüğünün bu ortamda yüksek olması nedeniyle, optimum formülasyon ve Celebrex® Kapsül arasındaki çözünürlük-çözünme hızı farkının çok azaldığı görülmüştür. Bu sonuç optimize edilen birlikte öğütülmüş selekoksib bileşiminin fizyolojik ortam pH'larında çok daha yüksek bir çözünme değerine sahip olduğunu göstermektedir (Bkz. Şekil 4.38.). Benzer sonuçların *in vivo* çalışmalarda da alınması beklenmiştir.

### **5.9. Selekoksib Formülasyonlarına İlişkin Hücre Kültürü Çalışmalarının Değerlendirilmesi**

Selekoksibin permeabilitesinin yüksek olmasından dolayı, biyoyararlanımın artırılmasında hız kısıtlayıcı basamağı oluşturan çözünürlük ve çözünme hızı

özelliklerinin iyileştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla daha önce yapılan çalışmalarda, formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddelerin ve uygulanan üretim teknolojilerinin meydana getirdiği yeni selekoksib şekillerinde çözünürlüğün artmasının permeabilite değerinde de artış meydana getirdiği bildirilmiştir (109, 170-173). Çalışmalarımız kapsamında Caco-2 hücreleri kullanılarak yapılan sitotoksosite deneylerinde optimum formülasyonun, işlem görmemiş selekoksib, fiziksel karışım ve Celebrex® Kapsül'e göre daha sitotoksik olduğu görülmüştür (Bkz. Tablo 4.33., Şekil 4.39.). Bu durumun süspansiyon örneklerindeki çözünmüş selekoksib miktarının optimum formülasyonda daha yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Sitotoksosite çalışmaları sonucunda, optimum formülasyon, fiziksel karışım, işlem görmemiş selekoksib ve Celebrex® Kapsül için hücre canlılığının %90'dan yüksek olduğu ortak selekoksib konsantrasyonun 5 µM olduğu tespit edilmiştir (Bkz. Tablo 4.33.). Bu konsantrasyon değeri elde edilecek şekilde hazırlanan süspansiyon örneklerinin permeabilite çalışmaları yapılmış ve literatürde yer alan çalışma sonuçları ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Sitotoksosite ve permeabilite çalışmalarında selekoksibin süspansiyon şekli hazırlanmıştır. Çözelti yerine süspansiyon ile çalışılmasının nedeni, hücre kültürü çalışmalarında en yaygın olarak kullanılan yardımcı çözücü olan DMSO'nun selekoksib formülasyonları için yüksek oranlarda kullanımına gereksinim olması ve bu oranın hücre canlılığını olumsuz etkilemesinden dolayıdır. Selekoksib etkin maddesinin permeabilite değeri, literatürde raporlanan permeabiliteden çok daha düşük değerde bulunmuştur (171, 174), bu durum uygulanan konsantrasyon, uygulanan dozaj şekli (süspansiyon), Caco-2 hücreleri kaynaklı olabilir. En yüksek permeabilite değerinin optimum formülasyon ile elde edilmesi, süspansiyon şeklindeki örnekler içerisinde en yüksek çözünmüş selekoksib miktarına optimum formülasyonun sahip olması ile ilişkilidir (Bkz. Tablo 4.34.) (109, 170-173). İlaç moleküllerinin çözünürlüğü iyonize form ile, hücre membranlarından geçişi iyonize olmayan form ile açıklanmaktadır. Bu durumda selekoksib yüksek permeabiliteye sahip olduğu için hazırlanan süspansiyon örneklerindeki çözünmüş selekoksib miktarı, apikal yüzeyden bazolaterale geçişte hücre membranından geçecek madde miktarı için belirleyici etkiye sahiptir. Celebrex® Kapsül'ün, fiziksel karışım ve etkin maddeden daha yüksek permeabilite değerine sahip olmasının, intrinsik çözünme hızı ve çözünme testlerinde olduğu gibi, yüksek miktardaki SLS ile yaş

granülasyon yapılması sonucu, granüllerin ıslanabilirliğinin artmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

### 5.10. Selekoksib Formülasyonlarına İlişkin Farmakokinetik Çalışmaların Değerlendirilmesi

Tez çalışmaları kapsamında geliştirilen selekoksib formülasyonunun *in vitro* çözünme ve *in vitro* permeabilite çalışmalarının tamamlanmasının ardından *in vivo* farmakokinetik çalışmalar planlanmıştır. Literatürde, selekoksib formülasyonlarının 2 mg/kg ve 100 mg/kg aralığında olmak üzere farklı dozlarda sıçanlara uygulanması şeklinde tasarlanan farmakokinetik çalışmalar yer almaktadır (107, 110, 117, 175-177). Açlık koşullarında Celebrex® Kapsül ile karşılaştırmalı olarak yapılan farmakokinetik çalışmalar referans alınarak 10 mg/kg ve 40 mg/kg uygulama dozları belirlenmiştir (110, 151). Test ürün ve referans ürünün suda disperse edilmesi sonucu oluşturulan süspansiyonlar oral gavaj yöntemi ile doğrudan sıçanların midesine transfer edilmiştir.

Phoenix WinNonlin (Version 8.1, Certara L.P.). istatistiksel yazılımı kullanılarak selekoksibin farmakokinetik parametreleri hesaplanmıştır (Bkz. Tablo 4.39.). Elde edilen sonuçlar, selekoksibin literatürde yer alan farmakokinetik verileri ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (175-187).

Selekoksibin 10 mg/kg dozda uygulanması sonucu, optimum formülasyonun maksimum konsantrasyona ulaşma süresi olan  $t_{maks}$  parametresi  $1,60 \pm 0,55$  saat olarak bulunmuştur. Bu durum *in vitro* çözünme hızının yüksek olmasına bağlı olarak absorpsiyon hızının da yüksek olduğunu göstermektedir. Celebrex® Kapsül'ün  $t_{maks}$  değeri ise daha önce yapılan çalışmaların sonuçları ile benzer ve  $2,60 \pm 1,34$  saat olarak bulunmuştur (180). Uygulama dozunun artması sonucu optimum formülasyonun ve referans ürünün  $t_{maks}$  değerleri arasındaki fark artmış ve sırasıyla  $3,80 \pm 2,28$  saat,  $6,00 \pm 3,67$  saat olarak hesaplanmıştır. Yonghyun Lee ve ark. tarafından yapılan çalışmada, selekoksibin farklı dozlarda uygulanması sonucu dozun artması ile daha uzun  $t_{maks}$  değerleri elde edildiği bildirilmiştir (175).

Biyoyararlanım için birincil öneme sahip farmakokinetik parametreler  $AUC_{0-t}$  ve  $C_{maks}$  değerleridir. Test ürünün, 10 mg/kg ve 40 mg/kg dozlarının açlık koşullarında uygulanmasını takiben elde edilen  $C_{maks}$  değeri her iki doz için de referans üründen 1,6

kat daha yüksek bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.39., Şekil 4.44.). Aynı dozda uygulama yapılmasına karşın test ürünün maksimum plazma konsantrasyonunun referans üründen yüksek olması, selekoksibin fizyolojik pH koşullarındaki çözünürlüğünün ve çözünme hızının artırılmasına bağlı olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

Optimum formülasyonun  $C_{maks}$  değeri 10 mg/kg ve 40 mg/kg dozlar için referans üründen yüksek olmasına rağmen, bu dozda  $AUC_{0-24}$  için benzer bir durum söz konusu olmamıştır. Optimum formülasyon ve referans ürünün 10 mg/kg uygulama dozu ile birbirine çok yakın  $AUC_{0-24}$  değerleri elde edilmiştir. 40 mg/kg dozda ise, optimum formülasyonun  $AUC_{0-24}$  değeri,  $C_{maks}$  parametresinde olduğu gibi referans üründen 1,6 kat daha yüksek bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.39., Şekil 4.44.).

Selekoksibin 200 mg dozdan sonra doğrusal olmayan farmakokinetik göstermesi, osteoartrit, romatoid artrit ve ankilozan spondilit tedavilerinde daha yaygın klinik kullanımı sınırlaması yönünden sakınca oluşturmaktadır. Selekoksibin biyolaranımının artırılması için geliştirilen yeni formülasyonların doğrusal farmakokinetik göstermesi de oldukça önemlidir. Yakın geçmişte yapılan, selekoksibin amino asit konjugatları ile ön ilaç formunun geliştirilmesi, bu ön ilacın bağırsakta selekoksibe dönüşmesi sonucu farmakokinetik profilin dozdan bağımsız olarak doğrusal olduğunun gösterilmesi ümit vaat eden yaklaşımlardır (175). Bu çalışmada selekoksib etkin maddesinin 10 mg/kg, 20 mg/kg ve 40 mg/kg dozlarda sıçanlara oral yoldan uygulanmasını takiben elde edilen  $AUC_{0-24}$  değerleri dozun artması ile orantısal olarak artmamış, birbirine yakın değerlerde bulunmuştur. Ancak selekoksibin amino asitler ile konjuge edilmesi sonucu oluşturulan selekoksib ön ilacının 10 mg/kg, 20 mg/kg ve 40 mg/kg dozlarda uygulanmasını takiben her doz için  $AUC_{0-24}$  değeri yaklaşık olarak 1,5 kat artmıştır (175). Çalışmalarımız kapsamında yapılan farmakokinetik deneylerde optimum formülasyonun dozunun 10 mg/kg'dan 40 mg/kg'a yükseltilmesi sonucu  $AUC_{0-24}$  değeri yaklaşık 2,7 kat artmıştır. Referans ürün için bu değişim yalnızca 1,8 kattır (Bkz. Tablo 4.39., Şekil 4.45.). Optimum formülasyonda doz artışına bağlı olarak  $AUC_{0-24}$  parametresinde gözlenen bu artışın, referans üründen daha yüksek ve doz artışı ile uyumlu olması, birlikte öğütme sonucu farmakokinetik özellikleri iyileştirilmiş bir bileşim elde edildiğini göstermektedir. Ancak doğrusal farmakokinetik elde edildiğinin kanıtlanması için 10 mg/kg ve 40

mg/kg dozlara ek olarak farklı dozlarda da farmakokinetik çalışmaların yapılması gereklidir.

Selekoksinin maksimum plazma konsantrasyonuna ulaştıktan sonraki eliminasyon fazında, eliminasyon hız sabitinin formülasyondan bağımsız, selekoksinin spesifik bir değeri olmasından dolayı formülasyonların yarılanma ömrünün farklı olması beklenmemektedir. Bu temel bilgi ile farmakokinetik analiz sonuçları değerlendirildiğinde; optimum formülasyonun ve referans ürünün her iki uygulama dozunda yarılanma ömrü 5,5-7,3 saat aralığında olmak üzere birbirine yakın ve literatür ile uyumlu bulunmuştur (175-187).

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır:

- Selekoksibin çözünürlük ve çözünme özelliklerinin iyileştirilmesi için, endüstriye uygulanabilir bir yöntem olan birlikte kuru öğütme teknolojisi seçilmiştir. Birlikte kuru öğütme işleminde selekoksib için en uygun yardımcı maddeler, ön tarama deneyleri ile belirlenmiştir. Polivinilpirolidon, mannitol ve sodyum lauril sülfat ile yapılan öğütmelerde en düşük partikül büyüklüğü ve en yüksek intrinsik çözünme hızı elde edilmiş, mannitolün öğütme bileşimine eklenmesi ile fizyolojik pH'larda çözünme hızının daha fazla arttığı, selekoksibin polimorfik yapısında daha az değişim olduğu görülmüştür.
- Seçilen öğütme bileşiminin (selekoksib + polivinilpirolidon + mannitol + sodyum lauril sülfat) ve üretim işlem parametrelerinin birlikte öğütülmüş selekoksib üzerindeki potansiyel riskleri, balık kılçığı (Ishikawa) diyagramı ile değerlendirilmiştir. Etkili olacağı düşünülen 6 etkenin etkisi, Plackett-Burman deney tasarımının iki düzeyde önerdiği 12 formülasyon ile test edilmiş, faktörler “etkili”-“etkisiz” olarak sınıflandırılmıştır. Bu aşamada formülasyonlar, ortalama partikül büyüklüğü, çözünürlük ve intrinsik çözünme hızı test sonuçlarına göre değerlendirilmiştir.
- Formülasyon parametrelerini optimize etmek için merkezi kompozit (*Central Composite*) deney tasarımı kullanılmıştır. Üç boyutlu cevap yüzey grafikleri ve kontur grafikleri ile etkenlerin etkisi değerlendirilmiş, en yüksek çözünme hızını sağlayan optimum formülasyon bileşimi belirlenmiştir.
- Bayes optimizasyon deney tasarımının merkezi kompozit deney tasarımına ilişkin 8 deneyden öğrendiği bilgiler ile sunduğu ve her yinelemede oluşturduğu farkı deney tasarımları ile toplamda 12 deney yapılmış, en yüksek intrinsik çözünme hızını sağlayan formülasyon bileşenleri belirlenmiştir. Merkezi kompozit deney tasarımına alternatif olarak daha az sayıda deney ile hedefe ulaşılabileceği görülmüştür.

- Optimize edilmiş birlikte öğütülmüş selekoksib bileşimi etkin madde kaynağı olarak kullanılarak kapsül formülasyonu geliştirilmiştir. Geliştirilen formülasyon ve referans ürünün farklı çözünme ortamlarında karşılaştırmalı çözünme profilleri oluşturulmuş, test ürünün çözünme hızının referans üründen oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir.
- Geliştirilen formülasyon, selekoksib etkin maddesi ve referans ürünün karşılaştırmalı permeabilite çalışmaları yapılmış, optimum formülasyonun permeabilitesinin selekoksib etkin maddesinden ve referans üründen yüksek olduğu belirlenmiştir.
- *In vitro* karakterizasyon çalışmalarında en iyi sonucu veren formülasyonun sıçanlarda, açlık koşulunda oral farmakokinetik çalışması yapılmıştır. 10 mg/kg ve 40 mg/kg dozlarında ilaç uygulamasını takiben optimum formülasyonun maksimum plazma konsantrasyonu; 40 mg/kg dozunda ilaç uygulamasını takiben optimum formülasyonun eğri altında kalan değeri referans üründen oldukça yüksek bulunmuştur.

Tez çalışmamızda birlikte kuru öğütme yöntemi kullanılarak tasarımla kalite yaklaşımı ile geliştirilen selekoksib bileşimlerinin *in vitro* ve *in vivo* karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. *In vitro* çalışmalar ile selekoksibin çözünürlüğünün ve çözünme hızının arttığı gösterilmiştir. İleriye yönelik çalışmalarda kristal, amorf ve/veya kristal-amorf karışımındaki her bir şeklin yüzde dağılımının belirlenmesi için daha ayrıntılı tanımlama testleri yapılabilir. Öğütme bileşimindeki polivinilpirolidon ve mannitol oranlarının polimorfik değişime etkisinin kantitatif olarak tayin edilmesi için çalışmalar yapılabilir. Stabilite çalışmalarında en az 6 aylık süreçte formülasyonun fizikokimyasal stabilitesi takip edilebilir. *In vivo* çalışmalarda oral gavaj ile 10 mg/kg ve 40 mg/kg dozlarda selekoksib uygulaması yapılmıştır. Test ürün için iki dozun  $C_{maks}$  ve AUC değerleri doz ile orantısal bir şekilde artmıştır. Ancak selekoksibin doğrusal farmakokinetik gösterdiğini gösterebilmek için 5 mg/kg, 20 mg/kg, 80 mg/kg gibi farklı dozlarda uygulama yapılarak farmakokinetik parametreler incelenebilir. *In vivo* çalışmalarda optimum formülasyon ve referans ürün aynı yitilikte uygulanmıştır. *In vitro* ve *in vivo* çalışma bulgularına göre test ürünün çözünme hızı ve biyoyararlanımı referans üründen 1,6 kat daha yüksektir. Bu nedenle test ürünün uygulama dozu, referans ürünün uygulama dozuna göre azaltılarak yeni bir *in vivo*

Çalıřma yapılabilir. Bu çalıřmalardan elde edilecek bulgular ile daha dūřuk yitilikteki selekoksib formūlasyonlarının farmakokinetik profili, piyasa ūrūnū ile karřılařtırılabilir.



## 7. KAYNAKLAR

1. Crofford LJ. Use of NSAIDs in treating patients with arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2013;15 Suppl 3(Suppl 3):S2-S.
2. Ong CK, Lirk P, Tan CH, Seymour RA. An evidence-based update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Clinical Medicine & Research.* 2007;5(1):19-34.
3. Foundation A. Arthritis by the numbers. 2019.
4. Pfizer. Value of rheumatoid arthritis treatment Pfizer News Pfizer; 2016 [Available from: [https://www.pfizer.com/news/featured\\_stories/featured\\_stories\\_detail/https://cdn.pfizer.com/pfizercom/health/VOMPaper\\_Rheumatoid\\_Arthritis\\_11-3-2016.pdf](https://www.pfizer.com/news/featured_stories/featured_stories_detail/https://cdn.pfizer.com/pfizercom/health/VOMPaper_Rheumatoid_Arthritis_11-3-2016.pdf)].
5. Loeser RF. The role of aging in the development of osteoarthritis. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association.* 2017;128:44-54.
6. Wanders A, Heijde D, Landewé R, Béhier JM, Calin A, Olivieri I, et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs reduce radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis: a randomized clinical trial. *Arthritis & Rheumatology.* 2005;52(6):1756-65.
7. Pharmaceuticals I. Introducing ZORVOLEX (diclofenac), the first lower-dose NSAID developed using Solumatrix fine particle technology. *PharmacyTimes*2013.
8. Pergolizzi JV, Jr., Raffa RB, Nalamachu S, Taylor R, Jr. Evolution to low-dose NSAID therapy. *Pain Management.* 2016;6(2):175-89.
9. Loh ZH, Samanta AK, Sia Heng PW. Overview of milling techniques for improving the solubility of poorly water-soluble drugs. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2015;10(4):255-74.
10. TIVORBEX (indomethacin) capsules highlights of prescribing information [Internet]. FDA. 2014 [cited 11.11.2021]. Available from: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2016/204768s003s004bl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/204768s003s004bl.pdf).
11. VIVLODEX (meloxicam) capsules highlights of prescribing information [Internet]. FDA. 2015 [cited 11.11.2021]. Available from: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2015/207233s000lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2015/207233s000lbl.pdf).
12. Stein CA, Levin R, Given R, Higano CS, Nemeth P, Bosch B, et al. Randomized phase 2 therapeutic equivalence study of abiraterone acetate fine particle formulation vs. originator abiraterone acetate in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: The STAAR study. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations.* 2018;36(2):81.e9-.e16.
13. Celebrex ® (celecoxib) Capsules highlights of prescribing information [Internet]. FDA. 2021 [cited 11.11.2021]. Available from: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2021/020998s056lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/020998s056lbl.pdf).

14. Gensler LS, Gianfrancesco M, Weisman MH, Brown MA, Lee M, Learch T, et al. OP0198 Combined effects of tumour necrosis factor inhibitors and nsaids on radiographic progression in ankylosing spondylitis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2018;77(Suppl 2):148.
15. Pridgen WL, Duffy C, Gendreau JF, Gendreau RM. A famciclovir + celecoxib combination treatment is safe and efficacious in the treatment of fibromyalgia. *J Pain Res*. 2017;10:451-60.
16. Reuben S, Buvanendran A, Kroin J, Raghunathan K. The analgesic efficacy of celecoxib, pregabalin, and their combination for spinal fusion surgery. *Anesthesia and Analgesia*. 2006;103:1271-7.
17. Seglentis highlights of prescribing information [Internet]. 2021 [cited 11.11.2021]. Available from: [https://www.kowapharma.com/documents/SEGLENTIS\\_Prescribing\\_Information.pdf](https://www.kowapharma.com/documents/SEGLENTIS_Prescribing_Information.pdf).
18. Concensi highlights of prescribing information [Internet]. FDA. 2018 [cited 11.11.2021]. Available from: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2018/210045s000lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/210045s000lbl.pdf).
19. Yu LX, Amidon G, Khan MA, Hoag SW, Polli J, Raju GK, et al. Understanding pharmaceutical quality by design. *AAPS Journal*. 2014;16(4):771-83.
20. ICH. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
21. N. Politis S, Colombo P, Colombo G, M. Rekkas D. Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2017;43(6):889-901.
22. Hancu G, Orlandini S, Papp LA, Modroiu A, Gotti R, Furlanetto S. Application of experimental design methodologies in the enantioseparation of pharmaceuticals by capillary electrophoresis: a review. *Molecules*. 2021;26(15):4681.
23. Mockus J. Bayesian approach to global optimization. 1 ed: Springer Netherlands; 1989. 270 p.
24. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res*. 1995;12(3):413-20.
25. Gregory K. Webster RGB, J. Derek Jackson. *Poorly Soluble Drugs* Jenny Stanford Publishing; 2016. 728 p.
26. Dunne A, Devane J, O'Hara T. The relationship between in vitro drug dissolution and in vivo absorption. *Journal of the Royal Statistical Society: Series D (The Statistician)*. 2001;48:125-33.
27. Sugano K, Terada K. Rate and extent limiting factors of oral drug absorption: theory and applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;104(9):2777-88.

28. Sugano K, Okazaki A, Sugimoto S, Tavornvipas S, Omura A, Mano T. Solubility and dissolution profile assessment in drug discovery. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2007;22(4):225-54.
29. Khadka P, Ro J, Kim H, Kim I, Kim JT, Kim H, et al. Pharmaceutical particle technologies: an approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014;9(6):304-16.
30. Alshora DH, Ibrahim MA, Alanazi FK. Chapter 6 - Nanotechnology from particle size reduction to enhancing aqueous solubility. In: Grumezescu AM, editor. *Surface Chemistry of Nanobiomaterials*: William Andrew Publishing; 2016. p. 163-91.
31. Williams HD, Trevaskis NL, Charman SA, Shanker RM, Charman WN, Pouton CW, et al. Strategies to address low drug solubility in discovery and development. *Pharmacol Rev*. 2013;65(1):315-499.
32. Hu J, Johnston KP, Williams RO, 3rd. Nanoparticle engineering processes for enhancing the dissolution rates of poorly water soluble drugs. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2004;30(3):233-45.
33. Dokoumetzidis A, Macheras P. A century of dissolution research: from Noyes and Whitney to the biopharmaceutics classification system. *International Journal of Pharmaceutics* 2006;321(1-2):1-11.
34. Szunyogh T, Ambrus R, Szabó-Révész P. Nanonization of niflumic acid by co-grinding. *Advances in Nanoparticles*. 2013;02:329-35.
35. Rasenack N, Müller BW. Micron-size drug particles: common and novel micronization techniques. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2004;9(1):1-13.
36. Merisko-Liversidge E, Liversidge GG. Nanosizing for oral and parenteral drug delivery: A perspective on formulating poorly-water soluble compounds using wet media milling technology. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011;63(6):427-40.
37. Piras CC, Fernández-Prieto S, De Borggraeve WM. Ball milling: a green technology for the preparation and functionalisation of nanocellulose derivatives. *Nanoscale Advances*. 2019;1(3):937-47.
38. Kesharwani SS, Bhat GJ. Formulation and Nanotechnology-Based Approaches for Solubility and Bioavailability Enhancement of Zerumbone. *Medicina*. 2020;56(11):557.
39. Jinno J, Kamada N, Miyake M, Yamada K, Mukai T, Odomi M, et al. Effect of particle size reduction on dissolution and oral absorption of a poorly water-soluble drug, cilostazol, in beagle dogs. *Journal of Controlled Release*. 2006;111(1-2):56-64.
40. Air Jet Mill. 2008. Available from: <http://www.jbmprispac.com/pd/15/air-jet-mill>
41. Baláž P, Achimovičová M, Baláž M, Billik P, Zheleva Z, Criado J, et al. Hallmarks of mechanochemistry: from nanoparticles to technology. *Chemical Society Reviews*. 2013;42:7571.

42. Planetary Ball Mill. 2008. Available from: <https://www.retsch.com.tr/tr/ueruenler/oeguetme/bilyali-oeguetuecue/pm-100/fonksiyon-oezellikler/>
43. Ajayi E. Fabrication of copper/reinforced carbon nanotube bipolar plate using cold spray. International Conference on Research Innovations in Science and Engineering (RISE'2016); Mauritius. 2016.
44. Zolriasatein A, Shokuhfar A, Safari F, Abdi N. Comparative study of SPEX and planetary milling methods for the fabrication of complex metallic alloy nanoparticles. *Micro & Nano Letters*. 2018;13(4):448-51.
45. Li M, Azad M, Davé R, Bilgili E. Nanomilling of drugs for bioavailability enhancement: a holistic formulation-process perspective. *Pharmaceutics*. 2016;8(2):17.
46. Burmeister CF, Kwade A. Process engineering with planetary ball mills. *Chemical Society Reviews*. 2013;42(18):7660-7.
47. Camargo I, Lovo J, Erbereli R, Fortulan C. Influence of media geometry on wet grinding of a planetary ball mill. *Materials Research*. 2019;22(6):e20190432.
48. Albetawi S, Abdalhafez A, Abu-Zaid A, Matrouk A, Alhourani N. Recent solubility and dissolution enhancement techniques for repaglinide a BCS class II drug: a review. *Pharmacia*. 2021;68(3):573-83.
49. Malamataris M, Taylor KMG, Malamataris S, Douroumis D, Kachrimanis K. Pharmaceutical nanocrystals: production by wet milling and applications. *Drug Discovery Today*. 2018;23(3):534-47.
50. Bartos C, Szabó-Révész P, Bartos C, Katona G, Jójárt-Laczkovich O, Ambrus R. The effect of an optimized wet milling technology on the crystallinity, morphology and dissolution properties of micro- and nanonized meloxicam. *Molecules*. 2016;21(4):507.
51. Bartos C, Jójárt-Laczkovich O, Gábor K, Budai-Szűcs M, Ambrus R, Bocsik A, et al. Optimization of a combined wet milling process in order to produce poly(vinyl alcohol) stabilized nanosuspension. *Drug Design, Development and Therapy*. 2018;Volume 12:1567-80.
52. Li N, DeGennaro MD, Liebenberg W, Tiedt LR, Zahr AS, Pishko MV, et al. Increased dissolution and physical stability of micronized nifedipine particles encapsulated with a biocompatible polymer and surfactants in a wet ball milling process. *Pharmazie*. 2006;61(7):595-603.
53. Chingunpitak J, Puttipatkhachorn S, Chavalitsheewinkoon-Petmitr P, Tozuka Y, Moribe K, Yamamoto K. Formation, physical stability and in vitro antimalarial activity of dihydroartemisinin nanosuspensions obtained by co-grinding method. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2008;34(3):314-22.
54. Bartos C, Jójárt-Laczkovich O, Regdon G, Szabó-Révész P. Robustness testing of milling process, analyzing the particle size distribution and crystallinity of the milled samples. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2020;139(1):393-8.

55. Slámová M, Prausová K, Epikaridisová J, Brokešová J, Kuentz M, Patera J, et al. Effect of co-milling on dissolution rate of poorly soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;597:120312.
56. Mir M, Hayat K, Hussain T, Khan HMs, Bukhari N. Ball mill based on co-milling, a promising way to enhance solubility of poorly soluble drugs employing norfloxacin as model drug. *Acta Poloniae Pharmaceutica*. 2018;75:155-65.
57. Li S, Lin X, Xu K, He J, Yang H, Li H. Co-grinding effect on crystalline zaltoprofen with  $\beta$ -cyclodextrin/Cucurbit[7]uril in tablet formulation. *Scientific Reports*. 2017;7(1):45984.
58. Lau M, Young PM, Traini D. A review of co-milling techniques for the production of high dose dry powder inhaler formulation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2017;43(8):1229-38.
59. Marouene Bejaoui HO, Haykel Galai. Ternary solid dispersion strategy for solubility enhancement of poorly soluble drugs by co-milling technique. In: Berrada M, editor. *Chitin and chitosan - physicochemical properties and industrial applications*: IntechOpen; 2021.
60. Chen X, Partheniadis I, Nikolakakis I, Al-Obaidi H. Solubility improvement of progesterone from solid dispersions prepared by solvent evaporation and co-milling. *Polymers*. 2020;12(4):854.
61. Desjardins PJ, Olugemo K, Solorio D, Young CL. Pharmacokinetic properties and tolerability of low-dose SoluMatrix diclofenac. *Clinical Therapeutics*. 2015;37(2):448-61.
62. Aaron Dodd FM, Marck Norret, Adrian Russell, H. William Bosch, inventor; Iceutica Pty Ltd, assignee. Diclofenac formulation patent EP2421525B1. 2017.
63. Bosch HW, inventor; Iceutica Pty Ltd, assignee. Formulation of meloxicam patent US9526734B2. 2016.
64. Aaron Dodd FM, Marck Norret, Adrian Russell, H. William Bosch, inventor; Iceutica Pty Ltd, assignee. Formulation of indomethacin patent US9095496B2. 2015.
65. Mura P, Cirri M, Faucci MT, Ginès-Dorado JM, Bettinetti GP. Investigation of the effects of grinding and co-grinding on physicochemical properties of glisentide. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2002;30(2):227-37.
66. Fan W, Zhu W, Zhang X, Xu Y, Di L. Application of the combination of ball-milling and hot-melt extrusion in the development of an amorphous solid dispersion of a poorly water-soluble drug with high melting point. *RSC Advances*. 2019;9(39):22263-73.
67. Nart V, França MT, Anzilaggo D, Riekes MK, Kratz JM, de Campos CEM, et al. Ball-milled solid dispersions of BCS Class IV drugs: Impact on the dissolution rate and intestinal permeability of acyclovir. *Materials Science and Engineering: C*. 2015;53:229-38.

68. Antosik-Rogóż A, Szafraniec-Szczęśny J, Gawlak K, Knapik-Kowalczyk J, Paluch M, Jachowicz R. Tableting solid dispersions of bicalutamide prepared using ball-milling or supercritical carbon dioxide: the interrelationship between phase transition and in-vitro dissolution. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2020;25(9):1109-17.
69. Kürti L, Kukovecz A, Kozma G, Ambrus R, Deli M, Szabó-Révész P. Study of the parameters influencing the co-grinding process for the production of meloxicam nanoparticles. *Powder Technology*. 2011;212:210-7.
70. Isaac J, Ganguly S, Ghosh A. Co-milling of telmisartan with poly(vinyl alcohol) – An alkalizer free green approach to ensure its bioavailability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2016;101:43-52.
71. Prabhu P, Patravale V. Dissolution enhancement of atorvastatin calcium by co-grinding technique. *Drug Delivery and Translational Research*. 2016;6(4):380-91.
72. Wlodarski K, Tajber L, Sawicki W. Physicochemical properties of direct compression tablets with spray dried and ball milled solid dispersions of tadalafil in PVP-VA. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2016;109:14-23.
73. Gieszinger P, Tomuta I, Casian T, Bartos C, Szabó-Révész P, Ambrus R. Definition and validation of the design space for co-milled nasal powder containing nanosized lamotrigine. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2018;44(10):1622-30.
74. Paczkowska M, Mizera M, Sałat K, Furgała A, Popik P, Knapik-Kowalczyk J, et al. Enhanced pharmacological efficacy of sumatriptan due to modification of its physicochemical properties by inclusion in selected cyclodextrins. *Scientific Reports*. 2018;8(1):16184.
75. Shin S-C, Oh I-J, Lee Y-B, Choi H-K, Choi J-S. Enhanced dissolution of furosemide by coprecipitating or cogrinding with crospovidone. *International Journal of Pharmaceutics*. 1998;175(1):17-24.
76. Hussain A, Smith G, Khan KA, Bukhari NI, Pedge NI, Ermolina I. Solubility and dissolution rate enhancement of ibuprofen by co-milling with polymeric excipients. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;123:395-403.
77. Szafraniec J, Antosik A, Knapik-Kowalczyk J, Kurek M, Syrek K, Chmiel K, et al. Planetary ball milling and supercritical fluid technology as a way to enhance dissolution of bicalutamide. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017;533(2):470-9.
78. Li J, Yang Y, Zhao M, Xu H, Ma J, Wang S. Improved oral bioavailability of probucol by dry media-milling. *Materials Science and Engineering: C*. 2017;78:780-6.
79. Beatrice P, Passerini N, Trastullo R, Keiser J, Zanolla D, Zingone G, et al. An explorative analysis of process and formulation variables affecting comilling in a vibrational mill: The case of praziquantel. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017;533(2):402-12.

80. FDA. Guidance for Industry: PAT - a framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing, and quality assurance. 2004.
81. ICH. Pharmaceutical Development Q8(R2). <https://www.ich.org/>; ICH; 2009.
82. ICH. Pharmaceutical Quality System Q10. <https://www.ich.org/>; ICH; 2008.
83. Beg S, Rahman Z. Central composite designs and their applications in pharmaceutical product development. In: Beg S, editor. Design of Experiments for Pharmaceutical Product Development: Volume I : Basics and Fundamental Principles. Singapore: Springer Singapore; 2021. p. 63-76.
84. Vining G, Kowalski S. An overview of composite designs run as split-plots. In: Lenz H-J, Wilrich P-T, editors. Frontiers in Statistical Quality Control 8. Heidelberg: Physica-Verlag HD; 2006. p. 342-51.
85. Wagner JR, Mount EM, Giles HF. 25 - Design of Experiments. In: Wagner JR, Mount EM, Giles HF, editors. Extrusion (Second Edition). Oxford: William Andrew Publishing; 2014. p. 291-308.
86. Witek-Krowiak A, Chojnacka K, Podstawczyk D, Dawiec A, Pokomeda K. Application of response surface methodology and artificial neural network methods in modelling and optimization of biosorption process. Bioresource Technology. 2014;160:150-60.
87. Sarrai AE, Hanini S, Merzouk NK, Tassalit D, Szabó T, Hernádi K, et al. Using central composite experimental design to optimize the degradation of tylosin from aqueous solution by photo-fenton reaction. Materials (Basel). 2016;9(6).
88. Hutter F, Kotthoff L, Vanschoren J. Automated machine learning. 1 ed. Hutter F, Kotthoff L, Vanschoren J, editors: Springer, Cham; 2019. XIV, 219 p.
89. Archetti F CA. Bayesian optimization and data science: Springer; 2019.
90. Williams CERaCKI. Gaussian processes for machine learning: The MIT Press; 2006.
91. Jones DR, Schonlau M, Welch WJ. Efficient global optimization of expensive black-box functions. Journal of Global Optimization. 1998;13(4):455-92.
92. Sano S, Kadowaki T, Tsuda K, Kimura S. Application of Bayesian optimization for pharmaceutical product development. Journal of Pharmaceutical Innovation. 2019:1-11.
93. Chemicals H. Celecoxib Drug Master File. 2013.
94. Public assessment report scientific discussion-Celecoxib capsules [Internet]. 2014. Available from: [https://mri.cts-mrp.eu/Human/Downloads/DE\\_H\\_4551\\_001\\_PAR.pdf](https://mri.cts-mrp.eu/Human/Downloads/DE_H_4551_001_PAR.pdf).
95. Pharmacopeia E. Celecoxib Celecoxib2021.
96. Garry G. Grahama ROD. Coxibs. Compendium of Inflammatory Diseases. 2016.
97. Celebrex clinical pharmacology biopharmaceutics review(s) [Internet]. FDA. 1999 [cited 11.11.2021]. Available from: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/99/21156-S007\\_Celebrex\\_biopharmr.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/99/21156-S007_Celebrex_biopharmr.pdf).

98. Pfizer. Celebrex Product SPC.
99. Roy J. 11 - Life-style drugs, statins, and COX-2 drugs. In: Roy J, editor. *An Introduction to Pharmaceutical Sciences*: Woodhead Publishing; 2011. p. 297-325.
100. Dadiboyena S, T. Hamme Ii A. Synthesis of celecoxib and structural analogs- a review. *Current Organic Chemistry*. 2012;16(11):1390-407.
101. Elyxyb highlights of prescribing information [Internet]. FDA. 2020 [cited 11.11.2021]. Available from: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2020/212157s0001bl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/212157s0001bl.pdf).
102. Gong L, Thorn CF, Bertagnolli MM, Grosser T, Altman RB, Klein TE. Celecoxib pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics*. 2012;22(4):310-8.
103. Davies NM, McLachlan AJ, Day RO, Williams KM. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of celecoxib: a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor. *Clinical Pharmacokinetics*. 2000;38(3):225-42.
104. Ha ES, Choo GH, Baek IH, Kim MS. Formulation, characterization, and in vivo evaluation of celecoxib-PVP solid dispersion nanoparticles using supercritical antisolvent process. *Molecules*. 2014;19(12):20325-39.
105. Homayouni A, Sadeghi F, Nokhodchi A, Varshosaz J, Afrasiabi Garekani H. Preparation and characterization of celecoxib dispersions in soluplus®: comparison of spray drying and conventional methods. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2015;14(1):35-50.
106. Homayouni A, Sadeghi F, Nokhodchi A, Varshosaz J, Garekani HA. Preparation and characterization of celecoxib solid dispersions; comparison of poloxamer-188 and PVP-K30 as carriers. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2014;17(5):322-31.
107. Knopp MM, Nguyen JH, Becker C, Francke NM, Jørgensen EB, Holm P, et al. Influence of polymer molecular weight on in vitro dissolution behavior and in vivo performance of celecoxib:PVP amorphous solid dispersions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2016;101:145-51.
108. Kwon HJ, Heo EJ, Kim YH, Kim S, Hwang YH, Byun JM, et al. Development and Evaluation of Poorly Water-Soluble Celecoxib as Solid Dispersions Containing Nonionic Surfactants Using Fluidized-Bed Granulation. *Pharmaceutics*. 2019;11(3).
109. Fong SY, Martins SM, Brandl M, Bauer-Brandl A. Solid phospholipid dispersions for oral delivery of poorly soluble drugs: investigation into celecoxib incorporation and solubility-in vitro permeability enhancement. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;105(3):1113-23.
110. He J, Han Y, Xu G, Yin L, Ngandeu Neubi M, Zhou J, et al. Preparation and evaluation of celecoxib nanosuspensions for bioavailability enhancement. *RSC Advances*. 2017;7(22):13053-64.



111. Jeong SC, Kim DS, Jin SG, Youn YS, Oh KT, Li DX, et al. Development of a novel celecoxib-loaded nanosuspension using a wet media milling process. *Pharmazie*. 2018;73(9):498-502.
112. Salimi A, Moghimipour E. Preparation and evaluation of celecoxib nanoemulsion for ocular drug delivery. *Asian Journal of Pharmaceutics*. 2017;11:543-50.
113. Nguyen TH, Tan A, Santos L, Ngo D, Edwards GA, Porter CJ, et al. Silica-lipid hybrid (SLH) formulations enhance the oral bioavailability and efficacy of celecoxib: an in vivo evaluation. *Journal Control Release*. 2013;167(1):85-91.
114. Rawat S, Jain SK. Solubility enhancement of celecoxib using  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2004;57(2):263-7.
115. Mandracchia D, Trapani A, Perteghella S, Sorrenti M, Catenacci L, Torre ML, et al. pH-sensitive inulin-based nanomicelles for intestinal site-specific and controlled release of celecoxib. *Carbohydrate Polymers*. 2018;181:570-8.
116. Matbou Riahi M, Sahebkar A, Sadri K, Nikoofal-Sahlabadi S, Jaafari MR. Stable and sustained release liposomal formulations of celecoxib: In vitro and in vivo anti-tumor evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018;540(1-2):89-97.
117. Ding Z, Wang L, Xing Y, Zhao Y, Wang Z, Han J. Enhanced oral bioavailability of celecoxib nanocrystalline solid dispersion based on wet media milling technique: formulation, optimization and in vitro/in vivo evaluation. *Pharmaceutics*. 2019;11(7):328.
118. Waymack PCHP, inventor; Kitov Pharma Ltd, assignee. Ameliorating drug-induced elevations in blood pressure by adjunctive use of antihypertensive drugs 2017.
119. Enrique Portillo SVC, inventor; Esteve Pharmaceuticals SA, assignee. Compositions comprising tramadol and celecoxib in the treatment of pain 2014.
120. Ankit Baheti BKP, Supritha Vakada, Rajeev Singh Raghuvanshi, inventor; Dr Reddys Laboratories Ltd, assignee. Oral composition of celecoxib for treatment of pain 2017.
121. Sugita K, Takata N, Yonemochi E. Dose dependent solubility permeability interplay for poorly soluble drugs under non-sink conditions. *Pharmaceutics*. 2021;13(3):323.
122. Bergström CAS, Box K, Holm R, Matthews W, McAllister M, Müllertz A, et al. Biorelevant intrinsic dissolution profiling in early drug development: Fundamental, methodological, and industrial aspects. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2019;139:101-14.
123. Rosenberger J, Butler J, Dressman J. A refined developability classification system. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;107(8):2020-32.
124. Lu JX, Murray J. Biochemistry, dissolution and solubility. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC.; 2020.

125. Sou T, Bergstrom CAS. Automated assays for thermodynamic (equilibrium) solubility determination. *Drug Discovery Today: Technologies* 2018;27:11-9.
126. Pharmacopeia U. Solubility measurements General Monograph 2020.
127. Murdande SB, Pikal MJ, Shanker RM, Bogner RH. Aqueous solubility of crystalline and amorphous drugs: challenges in measurement. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2011;16(3):187-200.
128. Taskinen J, Norinder U. In silico predictions of solubility. 52007. p. 627-48.
129. IUPAC SJC. Compendium of chemical terminology, 2nd ed. (the "Gold Book") 2019.
130. Dizaj SM, Vazifehasl Z, Salatin S, Adibkia K, Javadzadeh Y. Nanosizing of drugs: effect on dissolution rate. *Res Pharm Sci*. 2015;10(2):95-108.
131. Siepmann J, Siepmann F. Sink conditions do not guarantee the absence of saturation effects. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;577:119009.
132. Shekunov B, Montgomery ER. Theoretical analysis of drug dissolution: I. solubility and intrinsic dissolution rate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;105(9):2685-97.
133. Noyes AA, Whitney WR. The rate of solution of solid substance in their own solutions. *Journal of the American Chemical Society*. 1897;19(12):930-4.
134. Wood JH, Syarto JE, Letterman H. Improved holder for intrinsic dissolution rate studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1965;54(7):1068-.
135. Veegas TX. Measurement of intrinsic dissolution rates using two different apparatus. *Pharmaceutical Technology*. 2001:44-51.
136. Issa M, Ferraz H. Intrinsic dissolution as a tool for evaluating drug solubility in accordance with the Biopharmaceutics Classification System. *Dissolution Technologies*. 2011;18.
137. Etherson K, Dunn C, Matthews W, Pamelund H, Barragat C, Sanderson N, et al. An interlaboratory investigation of intrinsic dissolution rate determination using surface dissolution. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2020;150:24-32.
138. Tseng Y-C, Patel M, Zhao Y. Determination of intrinsic dissolution rate using miniaturized rotating and stationary disk systems. *Dissolution Technologies*. 2014;21:24-9.
139. Long CM, Tang K, Chokshi H, Fotaki N. Surface Dissolution UV imaging for investigation of dissolution of poorly soluble drugs and their amorphous formulation. *AAPS PharmSciTech*. 2019;20(3):113-.
140. Avdeef A, Tsinman O. Miniaturized rotating disk intrinsic dissolution rate measurement: effects of buffer capacity in comparisons to traditional Wood's apparatus. *Pharm Res*. 2008;25:2613-27.
141. Cynthia M. Berger OT, Dmytro Voloboy, Dana Lipp, Steven Stones, and Alex Avdeef. Technical Note: miniaturized intrinsic dissolution rate (Mini-IDRTM)

- measurement of griseofulvin and carbamazepine. *Dissolution Technologies*. 2007.
142. Alsenz J, Haenel E, Anedda A, Du Castel P, Cirelli G. Miniaturized INtrinsic DISSolution Screening (MINDISS) assay for preformulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;87:3-13.
  143. Svanbäck S, Ehlers H, Yliruusi J. Optical microscopy as a comparative analytical technique for single-particle dissolution studies. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014;469(1):10-6.
  144. Baboota S, Shakeel F, Ahuja A, Shafiq S, Ahmad S. Development and validation of a stability-indicating HPLC method for analysis of celecoxib (CXB) in bulk drug and microemulsion formulations. *Acta Chromatographia*. 2007;18.
  145. ICH. ICH topic Q 2 (R1) validation of analytical procedures: text and methodology <https://www.ich.org/>; ICH; 1995.
  146. Dolenc A, Kristl J, Baumgartner S, Planinšek O. Advantages of celecoxib nanosuspension formulation and transformation into tablets. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009;376(1):204-12.
  147. Tambosi G, Coelho PF, Luciano S, Lenschow ICS, Zétola M, Stulzer HK, et al. Challenges to improve the biopharmaceutical properties of poorly water-soluble drugs and the application of the solid dispersion technology. *Matéria (Rio de Janeiro)*. 2018;23(4).
  148. Bischl B, Richter J, Bossek J, Horn D, Thomas J, Lang M. mlrMBO: a modular framework for model-based optimization of expensive black-box functions. 2017.
  149. Dezani A, Dezani T, Caffaro A, Reis J, Serra C. Equilibrium solubility versus intrinsic dissolution: characterization of lamivudine, stavudine and zidovudine for BCS classification. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013;49:853-63.
  150. Kim H-I, Park SY, Park SJ, Lee J, Cho KH, Jee J-P, et al. Development and evaluation of a reconstitutable dry suspension to improve the dissolution and oral absorption of poorly water-soluble celecoxib. *Pharmaceutics*. 2018;10(3):140.
  151. Kwon HJ, Heo E-J, Kim Y-H, Kim S, Hwang Y-H, Byun J-M, et al. Development and evaluation of poorly water-soluble celecoxib as solid dispersions containing nonionic surfactants using fluidized-bed granulation. *Pharmaceutics*. 2019;11(3):136.
  152. Wang K, Sun CC. Direct compression tablet formulation of celecoxib enabled with a pharmaceutical solvate. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;596:120239.
  153. Lu GW, Hawley M, Smith M, Geiger BM, Pfund W. Characterization of a novel polymorphic form of celecoxib. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006;95(2):305-17.
  154. Minitab. *Designing an Experiment 2019* [Available from: <https://support.minitab.com/en-us/minitab/18/getting-started/designing-an-experiment/>].

155. Salgado C, Guénée L, Černý R, Allémann E, Jordan O. Nano wet milled celecoxib extended release microparticles for local management of chronic inflammation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;589:119783.
156. Rizk M, Toubar S, Ramzy E, Helmy M. Sensitive and validated TLC densitometry method coupled with fluorescence detection for quantitative determination of the newly co-formulated drugs, celecoxib and amlodipine besylate in tablet dosage form. *Acta Chromatographica*. 2021;34(2):150-61.
157. Saha RN, Sajeev C, Jadhav PR, Patil SP, Srinivasan N. Determination of celecoxib in pharmaceutical formulations using UV spectrophotometry and liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2002;28(3-4):741-51.
158. Center for Drug Evaluation and Research USFDA. Reviewer guidance, validation of chromatographic methods. 1994.
159. Shabir G, Lough WJ, Arain S, Bradshaw T. Evaluation and application of best practice in analytical method validation. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2007;30:311-33.
160. Shabir GA. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*. 2003;987(1):57-66.
161. Raffaele Cammarano FM, Almar Postma, Frank Caruso, inventor; Iceutica Pty Ltd, assignee. Methods for the preparation of biologically active compounds in nanoparticulate form patent US8808751B2. 2014.
162. iCeutica. US8735450B2.
163. Ullah M, Ali M, Abd Hamid SB. Surfactant-assisted ball milling: a novel route to novel materials with controlled nanostructure-a review. *Reviews on Advanced Materials Science*. 2014;37:1-14.
164. Bhatt V, Shete G, Bansal AK. Mechanism of generation of drug nanocrystals in celecoxib: mannitol nanocrystalline solid dispersion. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015;495(1):132-9.
165. Hixson AW, Crowell JH. Dependence of reaction velocity upon surface and agitation. *Industrial & Engineering Chemistry*. 1931;23(8):923-31.
166. Nerst W. Theorie der reaktionsgeschwindigkeit in heterogenen systemen. *Zeitschrift fur Physikalische Chemie*. 1904;47:52-5.
167. Bruner E. Reaktionsgeschwindigkeit in heterogenen systemen. *Zeitschrift fur Physikalische Chemie*. 1904;43:56-102.
168. Brunner E. S-lvT. Uberdie auflösungs geschwindigkeit festerkorper *Zeitschrift fur Physikalische Chemie*. 1900;35:283-90. .
169. Homayouni A, Sadeghi F, Nokhodchi A, Varshosaz J, afrasiabi garekani H. Preparation and Characterization of Celecoxib Dispersions in Soluplus (R):

- Comparison of Spray Drying and Conventional Methods. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*. 2015;14:35-50.
170. Kataoka M, Yano K, Hamatsu Y, Masaoka Y, Sakuma S, Yamashita S. Assessment of absorption potential of poorly water-soluble drugs by using the dissolution/permeation system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2013;85(3 Pt B):1317-24.
  171. Bozdağ-Pehlivan S, Subaşı B, Vural I, Unlü N, Capan Y. Evaluation of drug-excipient interaction in the formulation of celecoxib tablets. *Acta Poloniae Pharmaceutica*. 2011;68(3):423-33.
  172. Ventura CA, Giannone I, Paolino D, Pistarà V, Corsaro A, Puglisi G. Preparation of celecoxib-dimethyl-beta-cyclodextrin inclusion complex: characterization and in vitro permeation study. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2005;40(7):624-31.
  173. Yazdanian M, Briggs K, Jankovsky C, Hawi A. The "high solubility" definition of the current FDA guidance on Biopharmaceutical Classification System may be too strict for acidic drugs. *Pharm Res*. 2004;21(2):293-9.
  174. Wang T, Zhao P, Zhao Q, Wang B, Wang S. The mechanism for increasing the oral bioavailability of poorly water-soluble drugs using uniform mesoporous carbon spheres as a carrier. *Drug Delivery*. 2016;23(2):420-8.
  175. Lee Y, Kim J, Kim W, Yoon IS, Jung Y. Preparation and evaluation of amino acid conjugates of celecoxib as prodrugs to improve the pharmacokinetic and therapeutic properties of celecoxib. *Pharmaceutics*. 2020;12(11):1043.
  176. Choi JS, Ahn JB, Park JS. Amorphous multi-system of celecoxib improves its anti-inflammatory activity in vitro and oral absorption in rats. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;555:135-45.
  177. Yakushiji K, Ogino M, Suzuki H, Seto Y, Sato H, Onoue S. Physicochemical and biopharmaceutical characterization of celecoxib nanoparticle: Avoidance of delayed oral absorption caused by impaired gastric motility. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018;552(1):453-9.
  178. Nasr AM, Elhady SS, Swidan SA, Badawi NM. Celecoxib loaded in-situ provesicular powder and its in-vitro cytotoxic effect for cancer therapy: fabrication, characterization, optimization and pharmacokinetic evaluation. *Pharmaceutics*. 2020;12(12):1157.
  179. Kim MH, Kim DH, Nguyen DT, Lee HS, Kang NW, Baek MJ, et al. Preparation and evaluation of eudragit l100-peg proliponiosomes for enhanced oral delivery of celecoxib. *Pharmaceutics*. 2020;12(8):718.
  180. Jeon D, Kim K-T, Baek M-J, Kim DH, Lee J-Y, Kim D-D. Preparation and evaluation of celecoxib-loaded proliposomes with high lipid content. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2019;141:139-48.
  181. Nasr M. Influence of microcrystal formulation on in vivo absorption of celecoxib in rats. *AAPS PharmSciTech*. 2013;14(2):719-26.
  182. Liu Y, Sun C, Hao Y, Jiang T, Zheng L, Wang S. Mechanism of dissolution enhancement and bioavailability of poorly water soluble celecoxib by preparing

- stable amorphous nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010;13(4):589-606.
183. Ghorab DM, Amin MM, Khowessah OM, Tadros MI. Colon-targeted celecoxib-loaded Eudragit® S100-coated poly- $\epsilon$ -caprolactone microparticles: preparation, characterization and in vivo evaluation in rats. *Drug Delivery*. 2011;18(7):523-35.
  184. Davies NM, McLachlan AJ, Day RO, Williams KM. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Celecoxib. *Clinical Pharmacokinetics*. 2000;38(3):225-42.
  185. Angi R, Solymosi T, Erdősi N, Jordán T, Kárpáti B, Basa-Dénes O, et al. Preparation, pre-clinical and clinical evaluation of a novel rapidly absorbed celecoxib formulation. *AAPS PharmSciTech*. 2019;20(2):90.
  186. Yakushiji K, Sato H, Ogino M, Suzuki H, Seto Y, Onoue S. Self-emulsifying drug delivery system of celecoxib for avoiding delayed oral absorption in rats with impaired gastric motility. *AAPS PharmSciTech*. 2020;21(5):135.
  187. Choi J-S, Lee D-H, Ahn JB, Sim S, Heo K-S, Myung C-S, et al. Therapeutic effects of celecoxib polymeric systems in rat models of inflammation and adjuvant-induced rheumatoid arthritis. *Materials Science and Engineering: C*. 2020;114:111042.

## 8. EKLER

## EK-1: Etik Kurul İzin Belgesi



Kobay Deneysel Hayvanları Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret A.Ş.  
 I.O.S.B 21. Cd. 520. Sk. No:2/2 Yenimahalle ANKARA  
 Tel & Fax: 0 (312) 394 70 94  
 www.kobay.com.tr

KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURULU BAŞVURU ONAYI		
BAŞVURU BİLGİLERİ	Protokol Numarası	439
	Protokol Adı	Selekoksisib İçeren Formülasyonların Çözünürlük ve Çözünme Özelliklerinin Yapay Sinir Ağı Tasarımı Kullanılarak Optimizasyonu
	Başvuru Tarihi	06.12.2019
	Sorumlu Araştırmacı Adı-Unvanı	Prof. Dr. Levent ÖNER
	Sorumlu Araştırmacı Çalıştığı Kurum	Hacettepe Üniversitesi
	Yardımcı Araştırmacılar	Prof. Dr. Hakan EROĞLU Dr. Ecz. Yağmur AKDAĞ ÇAYLI Ecz. Aslıhan ARSLAN
KARAR BİLGİLERİ	Onay Numarası	439
	Onay Tarihi	14.01.2020
	Onaylanan Hayvan Türü ve Sayısı	Sprague Dawley Rat 16 adet erkek
	Onay Bilgileri	Proje amaç,gerekeçe , yaklaşım ve yöntem yönünden incelenmiş , çalışmanın gerçekleşmesinde etik sakınca bulunmadığına karar verilmiştir.
KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURUL ÜYELERİ	Etik Kurul Başkanı Veteriner Hekim A.Begüm BUĞDAYCI AÇIKKOL	
	Etik Kurul Başkan Yardımcısı Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI	
	Etik Kurul Üyesi Sorumlu Veteriner Hekim Salih SALAR	
	Etik Kurul Üyesi M. Kürşat DERİCİ	
	Etik Kurul Üyesi Veteriner Hekim Kaan YAVUZYİĞİT	
	Etik Kurul Üyesi Turgut ALTUN	
	Etik Kurul Üyesi Adil KIŞ	
	Etik Kurul Üyesi Uzman Diğdem Yöyen ERMIŞ	
	Etik Kurul Üyesi Ali VAROL	



02.12.2020

**Sn. Prof. Dr. Levent ÖNER**

Yerel etik kurulumuza yapmış olduğunuz başvuru işlemi ile ilgili olarak dilekçeniz etik kurulumuzca incelenmiş olup yürütücüsü olduğunuz 439 protokol numaralı ve 'Selekoksisib İçeren Formülasyonların Çözünürlük ve Çözünme Özelliklerinin Yapay Sinir Ağı Tasarımı Kullanılarak Optimizasyonu' başlıklı projenizin planlan hayvan sayısının 40 adete çıkarılması ve kan alma noktalarının 0(kör), 30, 60, 120, 180, 240, 360, 720 ve 1440. Dakika olarak revize edilmesi kurulumuzca onaylanmıştır.

---

Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret A.Ş.

Merkez Ofis : Uzay Çağı Caddesi, 1308. Sokak No:6 (Odtü Teknokent) Yenimahalle - Ankara

Şube Ofis : İ.O.S.B 21.Cadde 520.Sokak No:2/2 Yenimahalle – Ankara

(0312) 394 70 94 – (0542) 394 70 94

[www.kobay.com.tr](http://www.kobay.com.tr)– [bilgi@kobay.com.tr](mailto:bilgi@kobay.com.tr)



## EK-2: Patent Bilgisi

2021/10 Resmi Patent Bülteni

Türk Patent ve Marka Kurumu

Yayın Tarihi : 21.10.2021 629



(11) TR 2020 17034 B

## (12) Patent Belgesi

- (43) Başvuru Yayın Tarihi  
2021/09/21, 2021/9 Nolu Bülten
- (10) Başvuru Yayın No  
TR 2020 17034 A2
- (21) Başvuru Numarası  
2020/17034
- (22) Başvuru Tarihi  
2020/10/26
- (45) Patent Belgesinin Veriliş Tarihi  
2021/10/21
- (30) Rüçhan Bilgileri (32) (33) (31)
- (73) Patent Sahibi  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
Hacettepe Üniversitesi Rektörlüğü 06100 Altındağ  
Altındağ Ankara TÜRKİYE
- (72) Buluşu Yapanlar  
LEVENT ÖNER  
ASLIHAN ARSLAN
- (54) Buluş Başlığı  
KURU ÖĞÜTME YÖNTEMİ İLE HAZIRLANAN VE ÇÖZÜNME HIZI ARTTIRILMIŞ SELEKOKSİB  
İÇEREN FARMASÖTİK KOMPOZİSYONLAR
- (57) Özet  
Buluş, selekoksib veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu veya hidrati, povidon, mannitol ve en az bir farmasötik olarak kabul edilebilir ekspiyant içeren kuru öğütme ile hazırlanan farmasötik bir kompozisyon ve bu kompozisyondaki selekoksib:povidon:mannitol ağırlık oranı, selekoksib partikül boyutu ve kompozisyonun çözünme hızı ile ilgilidir.
- (51) Buluşun tasnif sınıfları  
A61K 31/635  
A61K 31/415
- (74) Vekil  
SENEM KAYAHAN (YALÇINER PATENT VE DAN.  
LTD. ŞTİ.)
- HAKAN EROĞLU

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property  
Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
18 November 2021 (18.11.2021)(10) International Publication Number  
**WO 2021/230849 A1**

- (51) **International Patent Classification:**  
A61K 31/635 (2006.01) A61K 31/415 (2006.01)
- (21) **International Application Number:**  
PCT/TR2021/050619
- (22) **International Filing Date:**  
17 June 2021 (17.06.2021)
- (25) **Filing Language:** Turkish
- (26) **Publication Language:** English
- (30) **Priority Data:**  
2020/17034 26 October 2020 (26.10.2020) TR
- (71) **Applicant:** HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ [TR/TR]; Hacettepe Üniversitesi Rektörlüğü, Çankaya/Ankara (TR).
- (72) **Inventors:** ÖNER, Levent; Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ABD, Sıhhiye, Çankaya/Ankara (TR). EROĞLU, Hakan; Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ABD, Sıhhiye, Çankaya/Ankara (TR). ARSLAN, Aslihan; Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ABD, Sıhhiye, Çankaya/Ankara (TR).
- (74) **Agent:** YALCINER, Ugur G. (YALCINER PATENT & CONSULTING LTD.); Remzi Oguz Arik Mah. Tunus Cad. No:85/3-4, 06680 Cankaya/Ankara (TR).
- (81) **Designated States** (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Designated States** (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,

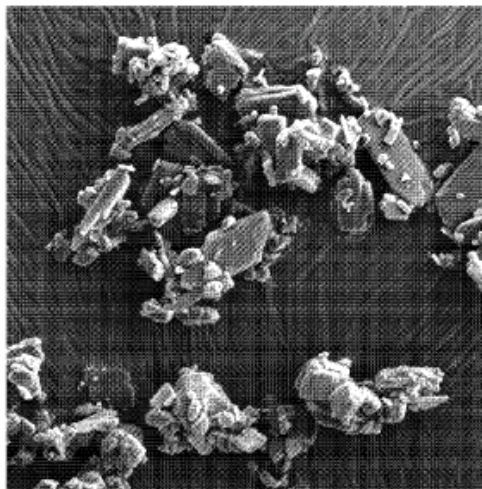
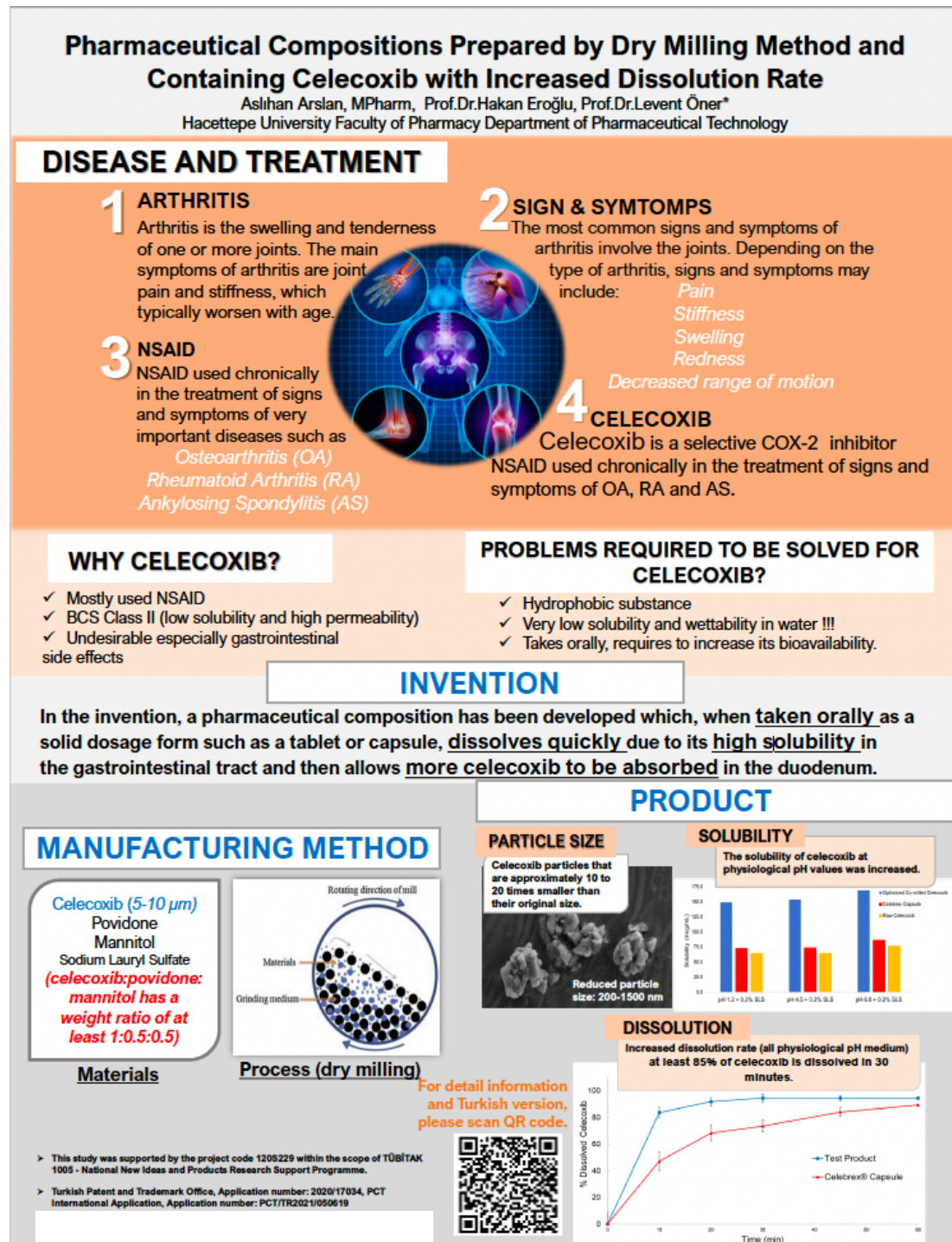
(54) **Title:** PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS PREPARED BY DRY MILLING METHOD AND CONTAINING CELECOXIB WITH INCREASED DISSOLUTION RATE

Figure 1

(57) **Abstract:** The invention relates to a pharmaceutical composition prepared by dry milling containing celecoxib or pharmaceutically acceptable salt or hydrate thereof, povidone, mannitol and at least one pharmaceutically acceptable excipient and the weight ratio of celecoxib : povidone : mannitol in this composition, the celecoxib particle size and the dissolution rate of the composition.

WO 2021/230849 A1

## EK-3: Poster Bilgisi

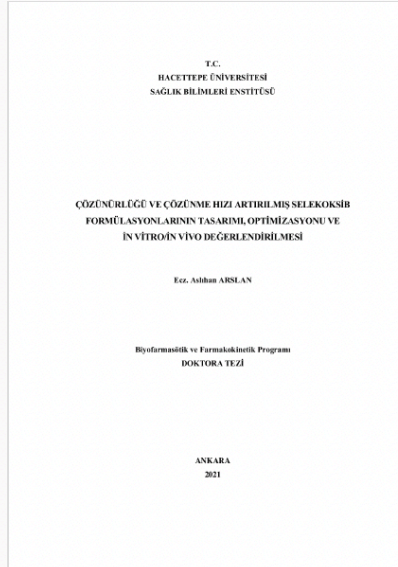


**EK-4: Turnitin Dijital Makbuz****Dijital Makbuz**

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Aslihan Arslan  
Ödev başlığı: Tez  
Gönderi Başlığı: ÇÖZÜNÜRLÜĞÜ VE ÇÖZÜNME HIZI ARTIRILMIŞ SELEKOKSİB F...  
Dosya adı: ASLIHAN\_ARSLAN\_Tez\_Du\_zeltme\_Turnitin.docx  
Dosya boyutu: 17.25M  
Sayfa sayısı: 171  
Kelime sayısı: 32,624  
Karakter sayısı: 224,350  
Gönderim Tarihi: 15-Ara-2021 09:12ÖS (UTC+0300)  
Gönderim Numarası: 1731324295



**EK-5: Tez Çalışması Orijinallik Raporu**

**TEZİN TAM BAŞLIĞI:** ÇÖZÜNÜRLÜĞÜ VE ÇÖZÜNME HIZI ARTIRILMIŞ SELEKOKSİB FORMÜLASYONLARININ TASARIMI, OPTİMİZASYONU VE İN VİTRO/İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ

**ÖĞRENCİNİN ADI SOYADI:** ASLIHAN ARSLAN

**DOSYANIN TOPLAM SAYFA SAYISI:** 171

---

ORJİNALLİK RAPORU

---

% **6**

BENZERLİK ENDEKSİ

% **6**

İNTERNET KAYNAKLARI

% **1**

YAYINLAR

% **1**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

---

TÜM KAYNAKLARI EŞLEŞTİR ( SADECE SEÇİLİ OLAN KAYNAĞI YAZDIR)

---

%2

★ [www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080](http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080)

İnternet Kaynağı

---

Alıntılarını çıkart üzerinde

Eşleşmeleri çıkar < 5 words

Bibliyografyayı Çıkart üzerinde

## 9. ÖZGEÇMİŞ