

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ- ФАРМАЦЕУТСКОГ ФАКУЛТЕТА
КОМИСИЈИ ЗА ПОСЛЕДИПЛОМСКЕ СТУДИЈЕ

Предмет: Извештај Комисије за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата Јоване Ајдарић

Наставно-научно Веће Фармацеутског факултета, Универзитета у Београду, на седници одржаној 18.05.2023. године именовало је Комисију за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата магистра фармације Јоване Ајдарић, под насловом:

„Примена вештачких неуронских мрежа у оптимизацији процеса лиофилизације у производњи есомепразол прашка за раствор за инјекције/ инфузије“

Комисија у саставу:

1. Др сц. Данина Крајишник, редовни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет
2. Др сц. Сандра Цвијић, редовни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет
3. Др сц. Љубиша Игњатовић, редовни професор, Универзитет у Београду – Факултет за физичку хемију
4. Александра Цатић Ђорђевић, ванредни професор, Медицински факултет Универзитета у Нишу

прегледала је приложену дисертацију и подноси Наставно-научном већу Фармацеутског факултета, универзитета у Београду следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. ПРИКАЗ САДРЖАЈА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторска дисертација кандидата Јоване Ајдарић под насловом „**Примена вештачких неуронских мрежа у оптимизацији процеса лиофилизације у производњи есомепразол прашка за раствор за инјекције/ инфузије**“ написана је на 107 страна текста, формата А4, фонтом *Times New Roman*, величине слова 12 и једноструким проредом. Дисертација је написана јасним и прегледним стилем и садржи 34 табеле, 59 слика и 103 литературна навода. Дисертација је организована у седам поглавља: Општи део (29 страна), Циљ истраживања (1 страна), Експериментални део (17 страна), Резултати и Дискусија (51 стране), Закључак (3 стране), Литература (5 страна) и Биографија (1 страна). На почетку дисертације представљен је Сажетак рада на српском и енглеском језику и садржај поглавља/потпоглавља, док се на крају налазе потписане изјаве кандидата о ауторству, истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и коришћењу докторске дисертације.

У општем делу представљена су досадашња научна сазнања везана за истраживања која су спроведена у оквиру ове докторске дисертације. У првом делу увода је описана активна/лековита супстанца коришћена у овом раду и дати су детаљи у вези фармаколошке групе лекова којој припада. У другом делу објашњен је поступак производње парентералних препарата, са освртом на процес лиофилизације, који је детаљно објашњен у наставку уводног дела. Након тога, описана је студијастабилности која се спроводи код парентералних препарата. У наставку општег дела објашњени су принципи оптимизације процеса производње и *scale-up*-а (трансфера производа од лабораторијске, преко пилот, до производне серије), након чега је дато детаљно објашњење концепта дизајнирања квалитета, односно, *Quality by Design* (QbD) приступа у фармацеутском развоју. На самом крају уводног дела, описане су вештачке неуронске мреже као алгоритми дубоког учења, једне од области *data mining*-а.

Циљ истраживања ове докторске дисертације је дефинисање критичних параметара производње и оптимизација процеса лиофилизације у процесу производње есомепразол прашка за раствор за инјекције/ инфузије који ће осигурати квалитет лека увећане серије током рока употребе. Овај циљ је остварен кроз следеће фазе:

1. У првој фази испитана је кинетика деградације лековите супстанце есомепразол-натријума у фармацеутском облику прашак за инјекције/инфузије, при чему је извршена идентификација нечистоћа које су последица деградације лековите супстанце као и испитивање стабилности реконституисаног производа. Након тога испитиван је утицај фактора формулације, критичних производних корака и критичних делова опреме/система на могућност добијања стабилног готовог производа увећане серије (*scale-up* са 17.000 на 33.000 бочица).

2. Полазећи од циљаног профила квалитета производа, применом *Quality by design* концепта, дефинисаног заједно са свим потенцијалним критичним параметрима процеса (енгл. *Critical Process Parameter - CPP*) и критичним својствима/атрибутима материјала (енгл. *Critical Material Attribute - CMA*) који могу утицати на процес производње и производ, спроведена је *FMEA* анализа (енгл. *Failure Mode Effect Analysis - FMEA*) и развијена је стратегија контроле за идентификоване критичне параметре процеса и критичне атрибуте квалитета материјала у производњи. Коначно, изграђена је и обучена вештачка неуронска мрежа како би се дефинисао тзв. простор за дизајнирање квалитета, односно, *design space* процеса лиофилизације описан границама температуре лиофилизатора у којима рН раствора есомепразола остаје стабилан за дефинисано време чувања напуњених делимично затворених бочица од тренутка пуњења до тренутка почетка лиофилизације.

3. У трећој фази су применом алгоритама учења предвиђани профили стабилности есомепразола у готовом производу и одређене границе рН вредности за реконституисани раствор финалног лиофилизованог производа које би осигурале циљани профил квалитета производа (садржај есомепразола и сродне супстанце у оквиру спецификација) током рока употребе од 36 месеци.

У **Експерименталном делу** детаљно су описани коришћени материјали, дизајн истраживања и методологија примењена у истраживању. Експериментални рад је подељен у 3 фазе.

У првој фази експерименталног рада спроведена је карактеризација нечистоћа које потичу од пута синтезе активне супстанце и оних које се сврставају у производе деградације, затим студија стабилности за испитивање R-енантиомера активне супстанце, студија компатибилности, формално испитивање стабилности, испитивање утицаја светлости на стабилност производа и испитивање током употребе, односно, *in*

use испитивање стабилности реконституисаног производа. Извршено је поређење резултата физичко-хемијских и микробиолошких испитивања за две величине серија готовог производа (величина серије од 17.000 бочица и увећана серија од 33.000 бочица). На основу добијених резултата, дефинисани су фактори формулације, критични производни кораци и критични делови опреме/система који имају највећи утицај на стабилност готовог производа увећане серије. У циљу добијања стабилног производа, уведено је директно замрзавање (корак пре-замрзавања) како би се раствор учинио инертним. Испитане су физичко-хемијске и микробиолошке карактеристике међупроизвода и готовог производа за увећане серије код којих је варирана температура од 20 °C, -5 °C, -15 °C, -30 °C, којој су изложене бочице након пуњења и пре почетка програма лиофилизације.

У другој фази примењен је *Quality by design* концепт у оптимизацији процеса лиофилизације у производњи увећане серије еомепразол прашка за раствор за инјекцију/инфузију. Анализа ризика за еомепразол прашак за инјекције спроведена је помоћу алата *FMEA*. Полазећи од циљаног профила квалитета производа, дефинисани су критичне карактеристике квалитета (енгл. *Critical Quality Attribute - CQA*), *SMA* и *CPP* који могу утицати на процес и производ. За све узорке напуњених делимично затворених бочица чуваних на полицама лиофилизатора (на 20 °C, -5 °C, -15 °C, -30 °C) у унапред дефинисаним временским тачакама (0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 24 h) праћени су рН, садржај еомепразола и сродне супстанце

Вештачка неуронска мрежа типа вишеслојног перцептрона је истренирана коришћењем резултата 32 експерименталне пробе (које су укључиле промену температуре полице и времена држања/излагања датим условима) како би се одабрала мрежа која најбоље описује утицај ових улазних променљивих на рН вредност раствора (а који је праћен као излаз мреже).

У трећој фази истраживања, за све произведене серије из прве фазе, извршена је детаљна анализа резултата одређивања рН вредности раствора у *bulk-u*, готовом производу, рН вредности измерених током студије стабилности, као и испитивање корелације измерених рН вредности са резултатима осталих *CQA* (садржај еомепразола и сродне супстанце) забележених током студија стабилности. Алгоритам дубоког учења за предвиђање профила стабилности еомепразола у лиофилизованом производу је примењен како би се одредиле границе рН вредности за реконституисани

раствор финалног лиофилизованог производа које би осигурале циљани профил квалитета производа током периода складиштења од 36 месеци. Вишеслојни перцептрон (енг. *Multilayer perceptron* - MLP) са четири слоја је коришћен као алат. Вредност рН раствора есомепразола и време складиштења (у месецима) су коришћени као улазни подаци за мрежу, док су садржај есомепразола и четири главне нечистоће представљали излазне параметре мреже.

Како би се планиране фазе истраживања реализовале, примењене су различите методе и технике, описане у наставку:

Поступак припреме и процес лиофилизације:

За припрему раствора лековите супстанце, коришћене су следеће сировине *Ph. Eur.* 10.0 [1] квалитета: есомепразол-натријум (*Uqifa*, Шпанија), динатријум-едетат (*Merck KgaA*, Дармстадт, Немачка) као комплексирајуће средство, натријум-хидроксид (*Merck KgaA*, Дармстадт, Немачка) за подешавање рН вредности и вода за инјекције (интерно припремљена) као растварач.

Производња есомепразол прашак за раствор за инјекцију/ инфузију започета је једноставним растварањем чврстих, лако растворљивих супстанци у води за инјекције, подешавањем рН и додавањем растварача до прописане запремине. Након припреме *bulk* раствора, употребом система за припрему и филтрацију раствора (произвођача *Lurgi TPS AG*, Бубендорф, Швајцарска), уследила је стерилна филтрација и пуњење у бочице и њихово делимично затварање (на машини *Sterifiill F200*, произвођача *IMA*, Фаирфиелд, ЦТ, САД). Након тога, спроведена је лиофилизација у лиофилизатору *Lyomax 16* (произвођача *BOC Edwards Pharmaceutical Systems*, Тонаванда, ЊЈ, САД), и финално провера потпуно затворених и запертлованих бочица (полуаутоматска машина за визуелну инспекцију *B90+*, произвођача *Seidenader*, Маркт Счабен, Немачка).

Одређивање рН:

Испитивање је извршено потенциометријски, методом *Ph. Eur.* 2.2.3.

Испитивање садржаја есомепразола и сродних супстанци:

У циљу одређивања садржаја, праћења стабилности есомепразола, детекције и одређивања његових потенцијалних деградационих производа коришћена је *RP HPLC* метода. У ту сврху коришћен је хроматограф *Acquity H-Class® UPLC* систем (*Waters*

Corporation, Милфорд, САД) и хроматографске колоне перформанси 250 mm x 4,6 mm и 150 x 4,6 mm пуњене модификованим силикагелом (C18) величине честица 5 μm .

Успостављање *design space*-а

Утицај критичних параметара процеса изабраних путем *FMEA* на критичне атрибуте квалитета производа је анализиран коришћењем вештачких неуронских мрежа помоћу софтвера *TIBCO Statistica® Software 13.5.0 (StatSoft Inc., Тулса, ОК, САД)*. Подаци из 32 експериментална циклуса су подељени у сет за тренинг, валидацију и тестирање (25:5:2). Мрежа вишеслојних перцептрона (MLP) је обучена коришћењем алгоритма повратног ширења. Најбоља мрежа је изабрана на основу најмањих вредности квадрата аритметичке средине (енгл. *Root Mean Square - RMS*) за скуп података о тренингу, валидацији и тестирању. Валидирани модел је коришћен за дефинисање *design space*-а за процес лиофилизације.

Изградња и примена вештачке неуронске мреже

Вештачка неуронска мрежа је изграђена применом софтвера *TIBCO Statistica® Software 13.5.0 (StatSoft Inc., Тулса, ОК, САД)*. Улазни подаци за мрежу су били рН вредност реконституисаног раствора девет серија лека (5 серија чуваних на температури од 20 °C и 4 серије на температури од -30 °C) и време (у месецима) током испитивања стабилности (0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36). Пет мрежних излаза одговарали су садржају есомепразола и нечистоћама (нечистоћа 4-хидрокси сулфида, нечистоћа сулфона, 5-метокси-1Х-бензимидазол-2-сулфинска киселина, 4-хидрокси нечистоћа). Подаци из 81 експерименталне серије су подељени на скупове података за тренинг, валидацију и тестирање мреже (64: 13: 4). Мрежа вишеслојних перцептрона (MLP) је обучена коришћењем алгоритма повратног ширења. Најбоља мрежа је изабрана на основу најмањих RMS вредности за скуп података генерисаних у току тренинга, валидације и тестирања мреже. Валидирани модел је коришћен за успостављање *design space*-а процеса лиофилизације.

Примењена методологија је адекватна за реализацију постављених циљева.

Поглавље **Резултати и Дискусија** сачињава детаљна анализа добијених резултата овог истраживања који су приказани текстуално, табеларно и графички. Резултати су приказани кроз 38 слика и 17 табела.

Поглавље **Закључак** садржи релевантне закључке проистекле из резултата овог истраживања и њихове свеобухватне анализе.

У поглављу **Литература** наведене су референце, односно 103 литературних навода коришћена у овој докторској дисертацији.

Поглавље **Биографија** садржи кратку биографију кандидата Јоване Ајдарић.

Б. ОПИС ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА

Резултати истраживања су приказани у оквиру три целине и одговарају резултатима три фазе истраживања.

У првој фази експерименталног рада анализиран је утицај особина активне супстанце, фактора формулације, критичних производних корака и критичних делова опреме/система на могућност добијања стабилног готовог производа увећане серије есомепразол прашка за раствор за инјекције/ инфузије. Резултати сакупљени на овај начин су омогућили дефинисање услова лиофилизације који обезбеђују добијање финалног производа специфицираног квалитета. Детаљно су испитани резултати физичко-хемијске и микробиолошке карактеризације добијени за увећане серије код којих је варирана температура којој су изложене бочице након пуњења и пре почетка програма лиофилизације од 20 °C, -5 °C, -15 °C, -30 °C (корак пре-замрзавања), као и максималан временски период у коме делимично затворене напуњене бочице раствором есомепразола могу да проведу од тренутка пуњења до момента почетка лиофилизације. Пуњење лиофилизатора на температури полица од -30 °C у поређењу са температуром од 20 °C, значајно продужава време за које раствор есомепразола остаје стабилан и без промена његових физичко-хемијских и микробиолошких карактеристика. Доказано је да је претходно замрзавање на температури која одговара температури у првом кораку програма лиофилизације (замрзавање, температура од -30 °C) довољно за директно замрзавање раствора у свим бочицама, при чему раствор постаје инертан и не долази до снижења рН вредности услед излагања кисеонику. На овај начин се обезбеђује квалитет раствора у напуњеним бочицама до самог краја производног процеса. Време пуњења бочица продужено на овај начин је довољно за *scale-up* до скоро двоструко веће величине серије. Осим тога, доказано је да увођење корака пре-замрзавања не утиче на процес лиофилизације, нити било коју другу фазу производње у претходно успостављеном производном процесу. Резултати добијени на овај начин потврђују да дефинисани параметри процеса и испитивање у току процеса, заједно са кораком пре-замрзавања, обезбеђују поуздану и поновљиву производњу есомепразол прашка за раствор за инјекцију/инфузију, испуњавајући све унапред дефинисане атрибуте квалитета и спецификације за финални производ.

У другој фази истраживања, на основу знања о производу и процесу производње из прве фазе истраживања, применом *QbD* концепта, у оквиру *FMEA* анализе ризика су

дефинисани сви *CQA* са највећим *RPN* скором (енгл. *risk priority number, RPN*). На основу најкритичнијих *CQA* за постизање жељеног квалитета есомепразол прашка за раствор за инјекцију/инфузију, процењене су све променљиве везане за формулацију и производни процес које би потенцијално могле утицати на добијање резултата изван спецификацијских граница. Оне променљиве формулације и процеса за које је постојала доказана гаранција добре контроле и позитивно искуство у погледу обезбеђивања одговарајућег квалитета производа су изостављене из даљег разматрања. Температура (собна температура, температура полица, температура замрзавања) којој је производ изложен, као и временско трајање ове изложености (време задржавања), које су у претходној фази корелиране као критични параметри процеса са променама рН вредности раствора као *CQA*, уз садржај есомепразола и сродних супстанци, су даље разматрани и коришћени као улазни подаци за дефинисање *design space*-а. Обучена је вештачка неуронска мрежа са вишеслојним перцептроном (MLP) и одабрана је мрежа која најбоље описује утицај ових улазних променљивих на рН вредност раствора. На основу добијених резултата дефинисан је *design space* за лиофилизацију увећаних серија који описују границе температуре полица и време које делимично затворене бочице могу да проведу изложене ваздуху, а да рН вредност раствора остане у спецификацијским границама.

У трећој фази истраживања успостављен је модел вештачке неуронске мреже који може да предвиди садржај есомепразола и профил нечистоћа у зависности од рН вредности финалног производа, за рок употребе од 36 месеци, као и да одреди границу рН вредности која ће обезбедити жељени квалитет производа током овог периода складиштења. Вештачка неуронска мрежа типа MLP, као алат за учење, у којој су рН вредност раствора есомепразола и време складиштења у месецима бити улазни подаци за мрежу, а садржај есомепразола и нечистоће резултати, односно, излазни параметри мреже, омогућила је одлично предвиђање и подударање експериментално добијених и предвиђених резултата и успостављање жељеног *design space*-а процеса лиофилизације. Као крајњи резултат добијен је *design space* који описују границе рН вредности реконституисаног производа, који ће задржати садржај есомепразола и садржај свих нечистоћа у оквиру спецификација током декларисаног рока употребе производа од 36 месеци.

В. УПОРЕДНА АНАЛИЗА РЕЗУЛТАТА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ СА ПОДАЦИМА ИЗ ЛИТЕРАТУРЕ

Добијени резултати истраживања су детаљно анализирани у контексту доступних литературних података.

Процес лиофилизације, "сушење замрзавањем", је процес припреме нестабилних фармацеутских производа у течном облику. Овај процес укључује припрему материјала, његово замрзавање, а затим уклањање воде комбинацијом сублимације и десорпције. Замрзавање је често најкритичнији део лиофилизације и има утицај на процес који следи, као и на карактеристике финалног производа. Са гледишта *scale-up*-а (увећања серије) и трансфера технологије, процеси лиофилизације остају изазов који захтева темељну карактеризацију лабораторијских и комерцијалних лиофилизатора и програма за лиофилизацију, као и разумевање целокупног производног процеса. Ту важност *QbD*, системског приступа развоју заснованог на управљању ризиком квалитета, посебно долази до изражаја. Знање стечено током животног циклуса развоја производа и процеса производње, према *QbD* приступу, може се користити за добијање жељеног *design space*-а, који даје могући радни опсег за оптимизацију операције лиофилизације. Ово би укључивало разумевање производа и процеса засновано на научним принципима и приступу заснованом на управљању ризиком који се може користити за контролу и верификацију процеса на нивоу производње (увећаних *scale-up* серија) на основу студија спроведених у репрезентативном лабораторијском моделу. Математички прорачуни се могу користити за конструисање и валидирање граница *design space*-а. Другим речима, оптимизацију процеса лиофилизације треба обезбедити помоћу *CQA*, *CPP* и *CMA*, дуж *design space*-а и применом технологија за анализу процеса (енгл. *Process analytical technology* - *PAT*).

Иако се примарном сушењу и даље придаје највећа пажња из перспективе оптимизације процеса лиофилизације и *scale-up*-а, критичност корака замрзавања у дизајну, развоју, оптимизацији и *scale-up*-у процеса лиофилизације све више се истиче [2]. Дизајн корака замрзавања (одржавање на температури изван опсега температуре замрзавања или контролисана нуклеација леда) индиректно управља механизмом замрзавања, што може даље утицати и на перформансе процеса и на квалитет производа. Посебно се наглашава поступак једноставног излагања производа температурним условима изнад крајње температуре замрзавања у одређеном периоду, које се обично користи за контролу температуре замрзавања ради кристализације

компоненти са побољшаним кристалинитетом [3-4]. Једн од студија показала је супротно у односу на до тада познате чињенице, да би већа брзина замрзавања требало да резултира мањим кристалима леда који резултирају мањим механичким стресом на честице [5]. Показало се да се боља редисперзибилност може постићи са температуром замрзавања од $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (него са нижом температуром од $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) и да, иако спорија, брзина замрзавања на тој температури не утиче значајно на промену величине честица, што генерално може умањити промену у расподели величине честица [5]. Што се тиче температуре замрзавања, истиче се чињеница да се не контролише температура производа директно, већ да се најпре контролише температура полица лиофилизатора и указује се на важност постојања одговарајуће безбедносне маргине унутар *design space*-а (контролног простора), што значи да задата тачка треба да буде далеко од максималне температуре коју производ може да поднесе без утицаја на његов квалитет [6]. Ово претпоставља да је *design space* заснован на уобичајеном понашању производа, због чега се предлаже да се ригорозно окарактерише утицај варијација унутар серије и разлике у увећаним серијама и да се ови квантитативни резултати укључе у процену *design space*-а са „преуском“ границом *design space*-а који се дефинише као сама температура колапса одређена поузданом техником [7-10]. Са друге стране, *design space* за сушење замрзавањем може бити изграђен уз узимање у обзир несигурности параметара модела, као и варијабилност параметара у бочицама у лиофилизатору и хетерогеност серије, без потребе за превеликом сигурносном маргином при избору услова рада за очување квалитета производа [11]. Проучавана је такође контрола нуклеације и кристализације леда током корака замрзавања за протеинске лекове, различите методе замрзавања и утицај замрзавања на остатак процеса и квалитет крајњег производа [4]. Као резултат ових испитивања, дате су смернице за избор оптималне температуре полица и подешавање притиска у комори потребних за постизање циљне температуре производа без термичког и/или преоптерећења преносом масе самог лиофилизатора. Са тим у вези, бесплатно доступан алат за симулацију и оптимизацију лиофилизације под именом *LyoPRONTO*, који се састоји од калкулатора замрзавања и примарног сушења, генератора *design space*-а и оптимизатора примарног сушења је представљен [12]. Овај алат је дизајниран да одреди профил за притисак у комори и/или температуру полица унутар ограничења опреме, производа и практичних ограничења. Такође када је реч о *scale-up*-у процеса лиофилизације, рачунарска динамика флуида је коришћена за проучавање и предвиђање независних променљивих (температура полица и притисак у комори) и променљивих одговора (отпор производа,

температура производа и време примарног сушења) за дату формулацију за лабораторијски и пилот лиофилизатор, како би се конструисао предиктивни *design space* за развој робусног процеса лиофилизације увећане величине серије [13].

Фокусирањем на метод за оптимизацију процеса лиофилизације, не треба занемарити чињеницу да активне супстанце могу бити изложене различитим стресним условима, који укључују промену рН вредности раствора, дехидратацију, повећану јонску јачину раствора, формирање граничне површине вода/лед и промене температуре током процеса лиофилизације. Избор одговарајућих стабилизатора стога може бити пресудан, не само за побољшање стабилности лека, већ може утицати и на параметре процеса лиофилизације. Посебно се истиче да комбинација често коришћених (трехалоза, сахароза) и нових стабилизатора (фенилаланин, леуцин, аргинин) може допринети побољшаној стабилности лека, посебно у агресивним условима сушења, што може довести до временски и новчано исплативије лиофилизације [14]. Поред тога, повећањем броја ексципијенаса који могу бити коришћени у формулацијама лиофилизованих лекова, увођењем нових система контејнера, пружајући свеобухватније разумевање механизма стабилизације и применом *QbD*-а, развој побољшаних формулација и дизајн оптимизованог процеса је умногоме олакшан, што резултира побољшањем квалитета производа [15].

Активна супстанца коришћена у овом раду је у облику натријумске соли, есомепразол-натријум, молекулске масе 367,4. Ово је (S)-енантиомер омепразола, најстаријег инхибитора протонске пумпе, који се користи у лечењу диспепсије, пептичког улкуса, гастроезофагеалне рефлуксне болести и Золлингер-Еллисоновог синдрома. Есомепразол-натријум је лековита супстанца изузетне хемијске осетљивости, што изискује да се на самом почетку развоја формулација окарактерише у погледу нечистоћа и путева деградације. Есомепразол-натријум је изузетно нестабилан, осетљив на топлоту и оксидацију и високо подложен киселој хидролизи са појавом великог броја производа деградације. Главни производи деградације есомепразола јављају се у условима термичке и оксидативне деградације. Европска фармакопеја описује девет окарактерисаних нечистоћа есомепразол натријума, које би се могао поделити у неколико група на основу потенцијалних путева деградације у којима су настале. Нечистоће настале током синтезе (нечистоће: А, Б, Ц, Д, Е, Ф, Г, Х, И); производи разградње настали процесом термичке деградације (нечистоће: А, Б, Ц, Д, Е, Ф, Г, Х);

продукти разградње у киселој средини (нечистоће Ц, Д, Ф, Г, Х); производи базно катализоване деградације (нечистоће: А, Б, Ц, Д, Ф, Г); фотодеградациони производи (нечистоће А, Д, Ф, Г) и производи оксидативне деградације (нечистоће: Д, Ф, Г). Хемијске реакције омепазола и његових аналога испитане су у одсуству и присуству 2-меркаптоетанола [16], као и утицај температуре и релативне влажности на стабилност омепазола у чврстом стању [17]. Такође је испитана стабилност есомепазола у присуству киселих, базних, оксидативних, фотолитичких и термалних фактора [18]. Доказано је да есомепазол подлеже разградњи под утицајем киселина, база, неутралним условима када подлеже хидролизи и оксидацији формирајући укупно 16 производа разградње, који су идентификовани применом спрегнуте LCMS/ MS технике [19]. Досадашњи подаци из литературе, као и студија форсиране деградације спроведена у оквиру експерименталног рада на овој докторској дисертацији такође показују да су рН, температура и кисеоник кључни фактори који утичу на стабилност есомепазола, од којих рН игра најважнију улогу. Поређени су циклуси процеса лиофилизације између лабораторијске и комерцијалне величине серије како би се развио стабилан лиофилизирани производ есомепазол-натријума за парентералну примену [20]. Оптималан процес лиофилизације који је упоредив између комерцијалне и лабораторијске серије је добијен када је подешавањем температуре сублимације обезбеђена температура узорка нижа од температуре распадања од $-19,2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Да би се развио оптимизован процес лиофилизације за есомепазол-натријума, укупно време циклуса, време замрзавања, "holding" време (време чувања бочица на полицама лиофилизатора пре започињања процеса лиофилизације), и време примарног и секундарног сушења је варирано, уз константан састав формулације [21]. Циклус лиофилизације укупног трајања од 35 сати је дао производ са најбољим резултатима, стабилан у прописаном периоду у условима убрзаног испитивања стабилности.

Услед повећаног садржаја кисеоника у раствору испитиваног производа, долази до брзог смањања рН вредности и последично до оксидације активне супстанце која може довести не само до смањења садржаја есомепазола, већ и до повећања садржаја нечистоћа. Како је *bulk* раствора током целокупног процеса производње, до тренутка пуњења у бочице, у потпуно у затвореном систему у струји азота, контролисане температуре, количине ваздуха и заштићен од светлости, ово се првенствено дешава са раствором у делимично затвореним бочицама од тренутка пуњења до тренутка почетка процеса лиофилизације. Овом нестабилношћу значајно се смањује максимално време

током којег делимично затворене бочице могу бити изложене ваздуху, односно максимално време трајања процеса пуњења које неће угрозити квалитет производа. Скраћено време трајања фазе пуњења значајно ограничава капацитет лиофилизатора и смањује број „добрих“ бочица готовог производа чији је садржај у складу са спецификацијским границама. Такав неробустан производни процес представља озбиљну препреку за повећање величине серије (*scale-up*) са постојећих 17.000 бочица на жељених 33.000 бочица и добијање финалног производа који задовољава све захтеве спецификације.

Изузетна нестабилност раствора есомепразола која се одражава на тешко контролисање рН вредности производа. Полазећи од рН вредности раствора у делимично затвореним бочицама, која се смањује различитим брзинама у зависности од услова којима су изложене пре саме лиофилизације (температура, кисеоник и време), отежава се контрола и предвиђање рН вредности финалног производа (реконституисаног производа), а самим тим и контрола његовог понашања током рока употребе. Због тога, било је неопходно познавање и успостављање безбедонских граница рН вредности реконституисаног раствора финалног производа које ће константно осигуравати добијање производа који задовољава све захтеве спецификација (садржај есомепразола, сродне супстанце) током рока употребе од 36 месеци.

Data mining коришћен у овом раду је препознат као корисно оруђе у предвиђању и контроли профила квалитета лекова у *Pharma 4.0* концепту у фармацеутској индустрији. Дубоко учење је област *data mining*-а која користи алгоритме који се називају вештачке неуронске мреже (*artificial neural networks* - ANN). Успешно се користи у последње две деценије у развоју формулација лекова и процеса њихове производње. Главна предност ANN-ова је у томе што омогућавају предвиђање бројних варијабли истовремено, као и успостављање сложених модела између зависних и независних променљивих, чак и у случајевима где су постојеће традиционалне методе, попут експерименталног дизајна, неуспешне. ANN-ови могу садржати различит број слојева, као и различит број неурона у сваком слоју; додатно, корисник може изабрати алгоритме учења, активацију и пост-синаптичке функције; стога постоје бројне могућности за мрежну архитектуру. У литератури постоји само неколико покушаја примене *data mining*-а за предвиђање стабилности лекова. У некој од претходних студија упоређене су вишеструка регресиона анализа (енгл. *multiple regression analysis* - MRA) и динамичка неуронска мрежа (енгл. *dynamic neural network* - DNN) за

предвиђање стабилности хидрокортизон 100 mg лиофилизованог прашка за инјекције. Производи разградње натријум-хидрокортизонсукцината су праћени током студија стабилности [22]. Сви подаци добијени током студија стабилности коришћени су за моделовање и потврђена је супериорност DNN над математичким моделовањем.

Литература:

1. European Pharmacopoeia, 10th edition. Strasbourg: Council of Europe (2020)
2. R. Esfandiary, S. K. Gattu, J. M. Stewart, S. M. Patel, Effect of freezing on lyophilization process performance and drug product cake appearance, *J. Pharmaceut. Sci.* (2016) 1427–1433
3. H. Kawasaki, T. Shimanouchi, Y. Kimura, Recent development of optimization of lyophilization process, *Hindawi J. Chem.* (2019)
4. X. Ch Tang, M. J. Pikal, Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice, *Pharmaceut. Res.* (2004) 21
5. M. D. Howard, X. Lu, M. Jay, T. D. Dziubla, Optimization of the lyophilization process for long-term stability of solid–lipid nanoparticles, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 38 (10) (2012) 1270–1279
6. S. M. Patel, M. J. Pikal, Lyophilization process design space, *J. Pharmaceut. Sci.* 102 (2013) 3883–3887
7. R. Pisano, D. Fissore, A. Barresi, P. Brayard, P. Chouvenc, B. Woinet, Quality by design: optimization of a freeze-drying cycle via design space in case of heterogeneous drying behavior and influence of the freezing protocol, *Pharmaceut. Dev. Technol.* 18 (1) (2013) 280–295
8. F. Jameel, M. Khan, Quality-by-design as applied to the development and manufacturing of a lyophilized protein product, *AmPharmRev* (2019) 20–24
9. R. Bogner, Vial-to-vial Variation for Freeze-Dried Products during Primary Drying A New Way to Approach Design Space, *PepTalk*, San Diego, California (2012)
10. M. Mujat, K. Greco, K. L. Galbally-Kinney, D. X. Hammer, R. D. Ferguson, N. Iftimia, P. Mulhall, P. Sharma, M. J. Pikal, W. J. Kessler, Optical coherence tomography- based freeze-drying microscopy, *Biomed. Opt EXPRESS* 3 (1) (2012) 55–63
11. A. Giordano, A.A. Barresi, D. Fissore, On the Use of mathematical models to build the design space for the primary drying phase of a pharmaceutical lyophilization process, *J. Pharmaceut. Sci.* 100 (1) (2011) 311–324
12. G. Shivkumar, P. S. Kazarin, A. D. Strongrich, A. A. Alexeenko, LyoPRONTO: an open-source lyophilization process optimization tool, *AAPS PharmSciTech* 20 (2019) 328
13. T. Zhu, E. M. Moussab, M. Wittingc, D. Zhoud, K. Sinhae, M. Hirthe, M. Gastensb, S. Shangd, N. Neree, S. C. Somashekare, A. Alexeenkoa, F. Jameelb, Predictive models of lyophilization process for development, scale-up/tech transfer and manufacturing, *Eur. J.*

14. M. Bjelošević, A. Z. Pobirk, O. Planinšek, P. A. Grabnar, EXipients in freeze-dried biopharmaceuticals: Contributions toward formulation stability and lyophilisation cycle optimisation, *Int. J. Pharm.* (2020) 576
15. J. C. Kasper, G. Winter, W. Friess, Recent advances and further challenges in lyophilisation, *Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut.* (2013)
16. A. Brandstrom, P. Lindberg, N. K. Bergman, T. Alminger, K. Ankner, U. Junggren, B. Lamm, P. Nordberg, M. Erickson, I. Grundevik et al. Chemical reactions of omeprazole and omeprazole analogues. I. A survey of the chemical transformations of omeprazole and its analogues, *Acta Chemica Scandinavica* (1989) 43, 536, 549, 569, 577, 587, 595
17. M. P. Brezeziska, Kinetics of omeprazole degradation in solid state *Acta Pol. Pharm.* (2011) 68, 753
18. Q. Dong, J. Zhu, Q. Sui, C. Tang, X. Wang, Y. Yu, Optimization of mobile phase for the determination of Esomeprazole and related compounds and investigation of stress degradation by LC–MS. *J. Sep. Sci.* (2013) 36, 1200
19. G. Shankar, M. B. Roshan, U. Suresh, M. Kanakaraju, G. S: Charan, S. Misrab, R. Srinivas, Identification and structural characterization of the stress degradation products of omeprazole using Q-TOF-LC-ESI-MS/MS an NMR experiments: Evaluation of the toxicity of the degradation products. *New J. Chem.* (2019) 43, 7294–7306
20. H. Baishya, L. S. Hui, X. X. Ping, Z. Zibin, Lyophilization cycle comparison and scale-up of esomeprazole sodium for injection between lab scale and scale-up batches vs FDM study *Int. J. Pharm. Sci. Res.* (2016) 7, 4407–4413
21. D. P. Venna, S. N. Allam, Enhancing Stability of an Anti Ulcer Drug through Lyophilization Technique. *Int. J. Sci. Res. Publ.* (2013) 3, 1-13
22. L. Solomun, S. Ibrić, V. Pejanović, J. Đuriš, J. Jocković, P. Stankovic, Z. Vujić, In silico methods in stability testing of Hydrocortisone, powder for injections: Multiple regression analysis versus dynamic neural network. *Hem. Ind.* (2012) 66, 647– 657

Г. ОБЈАВЉЕНИ И САОПШТЕНИ РЕЗУЛТАТИ КОЈИ ЧИНЕ САСТАВНИ ДЕО ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

I. Радови објављени у научним часописима међународног значаја:

1. **Ajdarić J, Ibrić S.** Optimization of the lyophilisation process for esomeprazole 40 mg powder for solution for injection/infusion using quality by design concept, 2022; <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103233>

Назив часописа: Journal of Drug Delivery Science and Technology

Импакт фактор (2022): 5.062;

Категорија часописа: M21

Ранг часописа у области *Pharmacology & Pharmacy* 75/279

2. **Ajdarić J, Ibrić S, Pavlović P, Ignjatović Lj, Ivković B.** Prediction of Drug Stability Using Deep Learning Approach: Case Study of Esomeprazole 40 mg Freeze-Dried Powder for Solution. *Pharmaceutics* 2021, 13(6), 829; doi:10.3390/pharmaceutics13060829

Назив часописа: Pharmaceutics;

Импакт фактор (2021): 6.321;

Категорија часописа: M21a

Ранг часописа у области *Pharmacology & Pharmacy* 24/276

Д. ЗАКЉУЧАК - ОБРАЗЛОЖЕЊЕ НАУЧНОГ ДОПРИНОСА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторска дисертација кандидата магистра фармације Јоване Ајдарић заснива се на испитивању и дефинисању критичних параметара производње и оптимизацији процеса лиофилизације у процесу производње есомепразол прашка за раствор за инјекције/инфузије.

Детаљном анализом приложене докторске дисертације Комисија је констатовала да је дисертација приказана на јасан и прегледан начин и да су сви постављени циљеви у потпуности реализовани. Експерименти су организовани и спроведени у складу са савременим стандардима истраживања у области *Quality by design*-а. На крају докторске дисертације приказани су закључци изведени на основу добијених резултата и доступних литературних података. Подаци представљени у дисертацији дају оригиналан допринос бољем разумевању сагледаваног проблема. Свему наведеном у прилог иде чињеница да су резултати ове докторске дисертације до сада публиковани у оквиру два рада у међународним часописима категорије М21.

На основу резултата истраживања у склопу докторске дисертације, могу се донети следећи закључци:

- Током студије стабилности спровеном на есомепразол-натријум, раствору за инјекцију/инфузију забележено је пет потенцијалних деградационих производа есомепразола (сулфонска нечистоћа, 4-хидрокси сулфонска нечистоћа, 4-хидрокси нечистоћа, 4-хидрокси сулфидна нечистоћа и Н-метил изомери). Критеријуми прихватљивости за производе деградације у лиофилизату есомепразол-натријума утврђени су узимајући у обзир критеријуме прихватљивости нечистоћа у полазној активној супстанци, њихово повећање током студија стабилности лека у развојној фази и оригинаторском производу, као и предложени рок употребе и препоручене услове складиштења за испитивани производ.
- Резултати студије испитивања R-енантиомера су показали да R-енантиомер није деградациони производ у предложеној формулацији који настаје под утицајем температуре. Ипак, резултати испитивања фотостабилности су указали на то да је R-енантиомер формиран у узорцима који су били директно изложени светлости, због чега је потребно производ чувати заштићен од светлости у

оригиналном паковању. На основу ових резултата и препоручених услова кондиционирања, испитивање хиралне чистоће је искључено из спецификације готовог производа.

- За све серије есомепразол лиофилизата испитане у оквиру формалне студије стабилности (кондициониране на условима 25 °C/ 60% RH, 30 °C/65% RH, 30 °C/ 75% RH и 40 °C/ 75% RH), резултати у тачкама испитивања – иницијално, након 3, 6, 9, 12, 18, 24 и 36 месеци су били у оквиру спецификацијских граница.
- Поређењем свих доступних резултата из спроведених испитивања, установљено је да је рН вредност серија које се чувају на температури од -30 °C, виша и стабилнија, у поређењу са серијама које се чувају на температури од 20 °C. Ова разлика је резултат различите изложености раствора производа кисеонику након пуњења, а пре лиофилизације, што произилази из ефекта да, чак и изложене у истом временском трајању, серије чуване на -30 °C одмах постају инертне и неосетљиве на све потенцијалне даље утицаје. Претходно замрзавање на температури која одговара оној у првом кораку програма лиофилизације (замрзавање, температура од -30 °C), довољна је да обезбеди директно замрзавање раствора у свим бочицама, чиме спречава смањење рН вредности услед излагања раствора кисеонику. Овим се осигурава да је квалитет раствора у напуњеним бочицама и до самог краја производног процеса исти као и за финални раствор у bulk-у на крају припреме. Време држања бочица у фази пуњења продужено на овај начин је довољно за *scale-up* до скоро двоструко веће величине серије. Осим тога, доказано је да увођење корака пре-замрзавања не мења својства самог процеса лиофилизације, нити било коју другу фазу производње у претходно успостављеном производном процесу, имајући у виду да је реч о температури замрзавања лековите супстанце, коришћеној у првом кораку процеса лиофилизације – фази замрзавања. Резултати добијени на овај начин потврђују да дефинисани параметри процеса и испитивање у току процеса, заједно са кораком пре-замрзавања, обезбеђују поуздану и поновљиву производњу есомепразола прашка за раствор за инјекцију/инфузију, испуњавајући све унапред дефинисане атрибуте квалитета и спецификације за финални производ.
- На основу знања о производу и процесу производње, применом QbD концепта, у оквиру *FMEA* анализе ризика дефинисани су сви *CQA* са највећим *RPN* скором.

Температура (собна температура, температура полица, температура замрзавања) којој је производ изложен, као и временско трајање ове изложености (време задржавања), корелирани су као критични параметри процеса са променама рН вредности раствора као *CQA*, уз садржај есомепразола и сродне супстанце, те су даље разматрани и коришћени као улазни подаци за дефинисање *design space*-а. Вештачка неуронска мрежа са вишеслојним перцептроном (MLP) је обучена коришћењем резултата 32 експерименталне пробе из прве фазе. Мрежа која је најбоље описала утицај ових улазних променљивих на рН вредност раствора је одабрана, а на основу резултата дефинисан је *design space* за лиофилизацију увећаних серија.

- На основу експериментално добијених података, развијен је *design space* описан границама температуре полица лиофилзатора (-10 °C до -30 °C) и *holding* временом (5-26 h) у којима рН вредност есомепразол раствора остаје стабилна и у складу са прописаном спецификацијом од 10,8-11,8.
- Изузев чињенице да је добијен много стабилнији производ, додатне предности ове оптимизације процеса производње су следеће:
 - увећана величина серије омогућава исплативији поступак лиофилизације и тиме редукује цену коштања производа и повећава конкурентност на тржишту;
 - оптимизација капацитета лиофилзатора и последично повећање броја произведених серија без инвестиција у нову опрему.
- Поред свега наведеног, успостављен је модел вештачке неуронске мреже који је способан да предвиди садржај есомепразола и профил нечистоћа у зависности од рН вредности финалног производа, за 36 месеци рока употребе. MLP мрежа као алат за учење, у којој су рН вредност раствора есомепразола и време складиштења у месецима били улази за мрежу, а садржај есомепразола и нечистоће резултати мреже, омогућила је одлично предвиђање и подударање експериментално добијених и предвиђених резултата и успостављање жељеног *design space*-а процеса лиофилизације. Развијен је *design space* описан границама рН вредности од 10,4–10,6 за готов производ и декларисаним роком употребе од 36 месеци, у којем нивои свих сродних супстанци и садржај есомепразола остају у оквирима спецификацијских граница током целокупног рока употребе. Другим речима, да би се све сродне супстанце и садржај есомепразола задржале у оквиру прописаних спецификацијских граница током читавог рока употребе, рН

вредност реконституисаног готовог производа би требало да буде у опсегу од 10,4-10,6. Одржавање рН вредности у овом суженом експериментално откривеном распону ће стабилизovati есомепразол прашак за раствор за инјекцију/инфузију и осигурати поуздану и поновљиву производњу, која испуњава све унапред дефинисане атрибуте квалитета и спецификације за финални производ.

Е. ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ ЗА ОЦЕНУ ЗАВРШЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу изложеног, Комисија закључује да докторска дисертација кандидата магистра фармације Јоване Ајдарић, чија је израда одобрена на седници Већа научних области медицинских наука Универзитета у Београду, задовољава се критеријуме оригиналног и адекватно написаног научног дела.

Кандидаткиња је успешно реализовала постављене циљеве истраживања, а резултати приказани у овој докторској дисертацији представљају значајан научни допринос у области фармацеутске технологије.

Резултати докторске дисертације су публиковани у два рада који су на SCI листи (категорије M21).

Комисија у наведеном саставу позитивно оцењује докторску дисертацију магистра фармације Јоване Ајдарић под називом **„Примена вештачких неуронских мрежа у оптимизацији процеса лиофилизације у производњи есомепразол прашка за раствор за инјекције/инфузије“** и предлаже Наставно-научном већу Фармацеутског факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај о завршеној докторској дисертацији и упути га Већу научних области медицинских наука, ради добијања сагласности за јавну одбрану докторске дисертације.

Чланови Комисије:

Др сц. Данина Крајишник, редовни професор,
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Др сц. Сандра Цвијић, редовни професор,
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Др сц. Љубиша Игњатовић, редовни професор,
Универзитет у Београду – Факултет за физичку хемију

Др. сц. Александра Цатић Ђорђевић, ванредни професор,
Медицински факултет Универзитета у Нишу